

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Département de biologie animale
Anatomie et physiologie comparées

FACULTÉ DES SCIENCES

Prof. H. HUGGEL

ETH-ZÜRICH
Institut für Hygiene und
Arbeitsphysiologie

ABTEILUNG X

Prof. E. GRANDJEAN

**TOXICITÉ DE CERTAINS COMPOSÉS DE LA
FUMÉE DE CIGARETTE: EFFETS DU
DIOXYDE D'AZOTE, DE L'ACÉTALDÉHYDE,
ET DE L'ACROLÉINE SUR LA SOURIS**

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l' Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique

par

Claude M. PHILIPPIN-CAPITAINE

de

Corcelles-Cormondrèche (Neuchâtel)

Thèse N° 1633

Zürich
aku-Fotodruck
1973

UNIVERSITÉ DE GENÈVE
Département de biologie animale
Anatomie et physiologie comparées

FACULTÉ DES SCIENCES

Prof. H. HUGGEL

ETH-ZÜRICH
Institut für Hygiene und
Arbeitsphysiologie

ABTEILUNG X

Prof. E. GRANDJEAN

TOXICITÉ DE CERTAINS COMPOSÉS DE LA
FUMÉE DE CIGARETTE: EFFETS DU
DIOXYDE D'AZOTE, DE L'ACÉTALDÉHYDE,
ET DE L'ACROLÉINE SUR LA SOURIS

THÈSE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur ès sciences, mention biologique

par

Claude M. PHILIPPIN—CAPITAINE

de

Corcelles-Cormondrèche (Neuchâtel)

Thèse N° 1633

Zürich
aku-Fotodruck
1973

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur E. GRANDJEAN, directeur scientifique, ETH-Zürich, et d'une commission composée des professeurs J. POSTERNAK, École de Médecine, Genève, H. HUGGEL, responsable devant la Faculté des Sciences, Genève, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENÈVE, le 21 novembre 1973



Le Doyen:
Jean Müller

Thèse N° 1633

À Monsieur le Professeur E. Grandjean, j'aimerais exprimer ici ma reconnaissance pour l'aide et les conseils qu'il a portés à la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur H.J. Huggel pour avoir bien voulu patronner cette thèse à l'Université de Genève, et pour le grand intérêt qu'il a témoigné à ce travail. Mes remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur J. Posternak qui a accepté de faire partie du jury de thèse, à Monsieur Dr.A.Gilgen pour maintes suggestions utiles, et à Monsieur A. Rhiner pour sa précieuse collaboration technique.

Table des matières

1. Introduction: La fumée de cigarette	3
1.1. Formation	3
1.2. Caractéristiques sur la façon de fumer	3
1.3. Propriétés chimiques et physiques de la fumée	4
1.4. Effets toxicologiques et psychologiques	5
2. But du travail	8
3. Méthodes	9
3.1. Animaux	9
3.2. Chambre d'expérimentation	9
3.3. Description des tests d'expérience	9
3.4. Analyse statistique	12

4. Dioxyde d'azote	13
4.1. Propriétés physico-chimiques	13
4.2. Effets pathogènes chez l'homme	14
4.3. Toxicologie	14
4.4. Méthode	19
4.5. Résultats	22
4.6. Discussion	35
5. Acétaldéhyde	39
5.1. Propriétés physico-chimiques	39
5.2. Effets pathogènes chez l'homme	39
5.3. Toxicologie	40
5.4. Méthode	42
5.5. Résultats	45
5.6. Discussion	54
6. Acroléine	58
6.1. Propriétés physico-chimiques	58
6.2. Effets pathogènes chez l'homme	59
6.3. Toxicologie	59
6.4. Méthode	63
6.5. Résultats	66
6.6. Discussion	77
7. Discussion générale et comparaison des trois gaz irritants	80
7.1. Comparaison des tests	80
7.2. Toxicité des trois substances étudiées	81
Bibliographie	85

1. Introduction : La fumée de cigarette [1]

1.1. Formation

La fumée de cigarette est due à la combustion incomplète du tabac. Elle est déterminée par plusieurs facteurs, en particulier la faible combustion de certains constituants de la feuille de tabac, l'apport insuffisant d'oxygène, et l'existence d'un gradient de température dans le cône de combustion de la cigarette. Pendant la combustion, apparaissent trois réactions simultanées:

- a) la pyrolyse des matières organiques, c'est-à-dire leur fractionnement pendant la décomposition thermique.
- b) la pyrosynthèse, c'est-à-dire la recombinaison des particules formées selon a): en composés qui ne figurent pas dans le tabac, par exemple des substances cancerigènes et cocarcinogènes telles que le 3,4-benzopyrène et certains goudrons.
- c) la distillation de composés tels que la nicotine et certains terpènes qui ne se fractionnent que partiellement.

La chaleur dégagée par la combustion de 1 gramme de tabac équivaut à 4,5 kcal.

1.2. Caractéristiques sur la façon de fumer

De nombreuses études ont été réalisées sur les habitudes individuelles des fumeurs. Les caractéristiques suivantes sont les plus générales:

fréquence :	une bouffée par minute
durée de l'aspiration :	0,5 à 4 secondes
volume de la bouffée :	20 à 60 ml
longueur du mégot :	15 à 30 mm

Le fumeur moyen fume sa cigarette en 10 minutes et aspire 10 bouffées par cigarette. Il absorbe ainsi 2,5 mg de nicotine.

L'inhalation de la fumée a une très grande importance physiologique. La fumée de cigarette, malgré sa saveur douce, a une réaction acide. Par contre la fumée alcaline des cigares et des pipes ne peut être inhalée parce que très irritante.

Lorsqu'on fume une cigarette, 90 % de la nicotine est résorbée dans les poumons. Pour les fumeurs de pipe et de cigares, la nicotine est résorbée dans la bouche et la trachée seulement. Le fumeur de cigares absorbe en moyenne 10 mg de nicotine.

Chez les fumeurs de pipe et de cigares, on n'enregistre pas d'augmentation de la mortalité par maladies coronaires et vasculaires. Ceci indique que la nicotine n'est pas la grande responsable de ces maladies.

La longueur du mégot joue aussi un rôle. En effet, si l'on fume le dernier tiers d'une cigarette, on absorbe deux fois plus de nicotine que lorsqu'on fume le premier tiers seulement.

Les pourcents du condensat (phase particulière) de la fumée sont absorbés dans l'organisme de la façon suivante:

de la première à la quatrième bouffée : 6 % par bouffée

de la cinquième à la huitième bouffée : 9 % par bouffée

de la neuvième à la dixième bouffée : 13,5 % par bouffée

Si le fumeur laissait les quatre dernières bouffées de sa cigarette, il éviterait d'absorber 50 % du condensat de la fumée.

1.3. Propriétés chimiques et physiques de la fumée

Pendant l'aspiration de la fumée, la température du cône de combustion atteint 900 °C environ, et redescend à environ 835 °C pendant l'auto-combustion. La fumée subit un rapide changement de température en traversant la cigarette: de 900 °C, celle-ci tombe à 30 °C sur quelques millimètres. La température de combustion entraîne la distillation de certains composants, tels que la nicotine.

Si la composition qualitative varie d'un tabac à l'autre, elle varie aussi de façon importante entre le début et la fin de la combustion: ainsi la concentration d'oxyde de carbone et d'acétaldéhyde double entre la première et la dernière bouffée. La concentration en nicotine peut quintupler.

On peut distinguer deux "courants" dans la fumée de cigarette: le courant principal (mainstream) qui correspond à l'activation de la combustion par aspiration d'une bouffée, et le courant secondaire (sidestream) qui correspond à l'autocombustion du tabac. La fumée de cigarette comprend deux phases: une phase particulière, et une phase gazeuse. Chacune d'elles comporte plus de 500 composés différents, dont 200 environ sont identifiés.

La phase particulière (aérosol dont les particules ont un diamètre de 0,1 à 0,8 μ), comprend notamment: des hydrocarbures aliphatiques, des hydrocarbures aromatiques (7 substances sont cancérogènes, par exemple le 3,4-benzopyrène), des aldéhydes et des acides, des phénols et des esters (substances cancérogènes), des alcaloïdes dont la nicotine.

Les substances cancérogènes ne sont pas présentes dans le tabac, mais se forment lors de sa combustion.

La phase gazeuse est formée de gaz et de vapeurs non condensées. Elle représente environ les 60 % de la fumée et comprend entre autres:

Co	42.000 ppm
NO ₂	250 ppm
acétaldéhyde	3200 ppm
acroléine	150 ppm

1.4. Effets toxicologiques et psychologiques

1.4.1. Epidémiologie chez l'homme

Il ne subsiste aujourd'hui aucun doute quant aux effets nocifs de la fumée de cigarette sur l'organisme humain. De nombreuses études de la mortalité et de la morbidité l'ont prouvé. On a montré que l'absorption régulière et prolongée (sans interruption pendant plus de quinze ans) d'un demi paquet de cigarettes par jour, diminue la longévité de deux ans et demi par rapport à la moyenne, et qu'un paquet par jour la réduit de cinq ans.

En effet, l'aspiration de la fumée dans les voies respiratoires est à l'origine de carcinômes des voies respiratoires, et de certains cancers des poumons. De plus, on sait que les bronchites chroniques, les emphysèmes et les modifications ventilatoires apparaissent plus souvent chez les fumeurs de cigarettes que chez les non fumeurs. Des observations faites chez des êtres humains montrent que les gaz irritants de la phase gazeuse (NO₂, aldéhydes, acroléine) paralysent les cellules ciliées de l'épithélium du tractus respiratoire et empêchent l'expectoration. Il serait ainsi possible que des substances cancérogènes s'accumulent en proportion élevée dans les bronches et dans les poumons. Les examens histologiques des bronches des fumeurs ont montré l'existence d'flots caractérisés par la modification des cellules épithéliales, et l'atrophie des cellules ciliées.

Nombre d'auteurs ont montré que la fumée de cigarette est l'un des principaux facteurs du développement des maladies coronaires, de l'**artériosclérose** oblitérante (maladie de Bûrger), d'une augmentation de la pression sanguine, et de diverses autres troubles du système circulatoire.

La double action stimulante (à faible dose) et paralysante (à dose élevée) de la nicotine est bien connue. Les effets cardiovasculaires de la nicotine sont les plus graves: augmentation du rythme cardiaque et de la pression sanguine, formation de thromboses.

La pollution atmosphérique dans les villes et les centres industriels peut provoquer les mêmes effets sur le tractus respiratoire. Mais, chez les fumeurs, on peut affirmer que, la fumée de cigarette, bien plus que la pollution atmosphérique, joue un rôle bien plus important dans les effets pathologiques cités plus haut.

1.4.2. Effets psychologiques

Malgré la menace permanente que constitue le tabac pour leur santé, les fumeurs éprouvent souvent de grandes difficultés à s'abstenir. Ceci montre que l'acte de fumer s'accompagne d'effets psychologiques profonds, dont notamment, un effet stimulant ressenti surtout au cours d'un travail intellectuel, suivi d'un effet calmant. Ces deux effets correspondent à l'action excitante, puis calmante de la nicotine au niveau du système nerveux central.

Citons deux importantes catégories de fumeurs: Ceux qui s'empressent, dès le matin, d'atteindre le degré de saturation en nicotine qui leur procure une sensation de bien-être, et ceux qui ne fument que dans les moments de contrariété, espérant ainsi apaiser les troubles psychologiques dus à leurs conflits. Ce dernier type de fumeurs représente les 40 % de tous les fumeurs et appartient à la catégorie des toxicomanes.

L'acte de fumer est devenu un acte social, comme manger et boire. La cigarette surtout joue un rôle important. Elle est un luxe (inutile à l'existence), on peut l'offrir ou l'échanger. Elle devient donc symboliquement un objet valorisant pour celui qui la reçoit ou qui l'offre. Chez l'adolescent, la première cigarette joue psychologiquement un rôle important. Elle lui permet de s'identifier à ses camarades ou à ses parents, et de se faire accepter dans le clan des adultes.

Fumer diminue l'appétit (par action de la nicotine au niveau hypothalamique). Il se peut que cet effet soit inconsciemment utilisé par certains fumeurs pour réprimer une boulimie sous-jacente. En confirmation de cette hypothèse, on a souvent remarqué une importante augmentation de poids chez des fumeurs privés de cigarettes.

1.4.3. Toxicologie chez les animaux de laboratoire

La fumée totale de la cigarette, les phases gazeuse et particulaire, les composés isolés de la fumée furent étudiés sur des animaux de

laboratoire et sur des organes isolés d'animaux (muqueuse, trachée, épithélium cilié, etc.)

Pour plus de détails sur les expériences de toxicologie chez les animaux de laboratoire, consulter les travaux suivants: Dontenwill et al [4], Harris et Negroni [5], Reckzeh et Dontenwill [6], Reckzeh et al [7], Rücker et Dontenwill [8]. Le tableau 1 donne un aperçu de divers résultats.

Tableau 1. Résumé des expériences de toxicologie chez les animaux de laboratoire. [1, p. 258 - 315]

Badigeonnages de l'épiderme avec des composés cancérogènes

<u>auteurs</u>		<u>animaux</u>	<u>résultats</u>
Wynder et al	1955	souris	carcinomes et papillomes
Sugiura	1956	souris	carcinomes et papillomes
Roe et al	1959	souris	papillomes
Roe	1960	souris	tumeurs de la peau
Cowdry et al	1961	souris	cancer de la peau

Inhalation de la fumée

Essenberg	1952	souris	tumeurs pulmonaires
Mühlbock	1955	souris	tumeurs pulmonaires
Essenberg et al	1956	souris	tumeurs
Leuchtenberg et al	1958	souris	hyperplasie et métaplasie des cellules basales
Guérin	1959	rats	tumeurs des poumons et de la cavité orale
Leuchtenberg et al	1960a	souris	bronchites, prolifération atypique des cellules épithéliales.
Dontenwill et Mohr	1962	hamsters	métaplasies bénignes, foyers d'accroissements papillaires de l'épithélium bronchique.
Holland et al	1963	lapins	hyperplasie de la muqueuse trachéo-bronchiale.
Harris et Negroni	1966	souris	leucémies, modifications pulmonaires, carcinomes alvéolaires, nodules métaplasiques.

2. But du travail

Comme nous le voyons dans le chapitre précédent, les effets de la fumée de tabac sur les voies respiratoires ont une importance considérable: Le Terry Report (1964) a montré que la mortalité due à des bronchites ou à des emphysèmes occupe le deuxième rang. La mortalité due à ces maladies est six fois plus élevée chez les fumeurs que chez les non fumeurs.

L'hypothèse suivante s'impose: les effets pathogènes de la fumée de tabac sur les voies respiratoires sont en relation avec les composés irritants de la fumée de cigarette.

Les substances irritantes: les phénols, les oxydes d'azote, les aldéhydes, en particulier l'acroléine et l'acétaldéhyde retiennent notre attention, puisqu'ils sont présents dans la fumée de cigarette, et qu'ils sont connus pour leurs propriétés spécifiques telles que: arrêt de l'activité ciliaire du tractus respiratoire, hypoxémie, bronchites chroniques, broncho-constriction, rhinites, emphysèmes.

Ceci nous pousse à étudier de plus près les effets toxicologiques aigus et chroniques de ces gaz irritants. Parmi ceux-ci, nous choisissons le dioxyde d'azote, l'acétaldéhyde, et l'acroléine.

Nous nous proposons d'étudier en particulier les effets physiologiques sur les performances physiques des souris. Pour ce faire, nous choisissons, comme critère, le test de natation, car nous pensons qu'un effet toxique sur les voies respiratoires devrait se manifester par une baisse de la capacité physique des animaux.

Dans des essais chroniques, nous suivons l'évolution du poids corporel. Ce critère est considéré comme un test sensible pour évaluer un état d'intoxication générale.

En plus des résultats de mortalité aiguë et chronique, nous effectuons un certain nombre d'analyses histologiques des voies respiratoires des souris.

Sur la base de ces tests, nous établissons les concentrations pour lesquelles les gaz irritants mentionnés ci-dessus provoquent des effets physiologiques et toxicologiques statistiquement assurés.

3. Méthodes

3.1. Animaux

Pour nos expériences, nous avons choisi des souris albinos mâles de la souche I.C.R., provenant de la clinique vétérinaire universitaire de Zürich. Les animaux pèsent entre 25 et 30 g à leur arrivée. Ils subissent une période d'adaptation d'une semaine avant le début des expériences, semaine pendant laquelle ils ont à manger et à boire ad libitum.

Pendant les expériences, ils ne reçoivent à boire et à manger qu'après les heures d'exposition. Les animaux sont répartis en groupes d'après une table de nombres aléatoires [9].

3.2. Chambre d'expérimentation

Pour exposer nos animaux au NO_2 , à l'acroléine, et à l'acétaldéhyde, nous avons choisi trois chambres d'expérimentation étanches en plexiglas. Deux d'entre-elles abritent les animaux exposés aux gaz irritants, la troisième abrite les animaux contrôle qui inhalent de l'air frais. Les chambres de 275 litres chacune sont soumises à une circulation du mélange air-gaz irritant d'un débit de 720 litres par heure. Le mélange est donc renouvelé 2,5 fois par heure.

Nous nous sommes assurés que le mélange air-gaz se répartit uniformément dans la chambre d'expérimentation. Pendant les expériences, nous avons contrôlé la température de l'air ambiant et de celui de la chambre d'expérimentation. Dans cette dernière, nous avons constaté une légère augmentation de la température d'environ trois degrés, au cours des expériences.

La concentration des substances étudiées dans la chambre est donnée en ppm (parts per million), c'est-à-dire en ml par m^3 .

3.3. Description des tests d'expérience

Nos expériences reposent sur les six tests suivants:

3.3.1. Le test de natation

Pour nos tests de natation, nous avons choisi la méthode de Bättig [10] qui mesure les temps de natation de rats dans un canal. Après de nombreuses expériences préalables, nous avons modifié l'appareillage et adapté le test à nos souris car le bruit, la lumière, et la ventilation ne jouaient aucun rôle, seule la charge était un facteur déterminant dans la mesure de la capacité physique.

Si la souris s'arrête en chemin pour se reposer, la charge accrochée à sa queue l'entraîne loin de son but et récompense (sortir de l'eau). La charge est donc un facteur important de la motivation. En psychologie expérimentale, on appelle "motivation" la force mesurable avec laquelle un organisme cherche à atteindre un but. Elle est déterminée par trois facteurs principaux : l'état de tension biologique interne (en terme du nombre d'heures de déprivation en eau, en aliments, etc), la dépense énergétique nécessaire pour atteindre un but (mesurée par la hauteur des obstacles, la longueur des parcours, etc), et la valeur de la récompense (donnée par ses aspects quantitatifs, qualitatifs, etc), voir [81].

Le test de natation mesure la capacité physique pour des efforts répétés.

Appareillage: Un canal en tôle mesurant 2,0m de long, 0,07m de large, 0,38 m de profondeur, est rempli d'eau à 20 °C. A une extrémité de ce canal se trouve la rampe de sortie. A l'exception de 20 cm à chaque extrémité, le canal est recouvert d'une toile plastifiée noire, l'intérieur du canal est peint en noir pour l'assombrir. Les animaux tirent une charge de 0,75 g. Les poids agissent horizontalement dans le sens opposé au mouvement des animaux. Leur action est transmise à l'aide d'un fil de nylon fixé à la queue de l'animal par un sparadrap, et supporté par des poulies selon la figure 1.

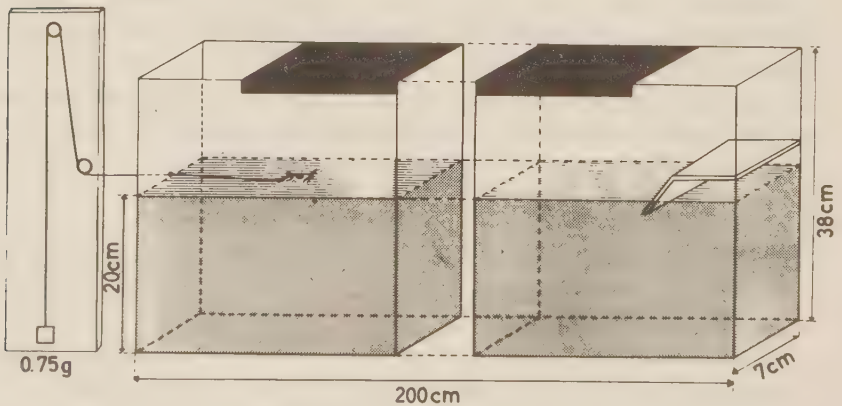


Fig.1 Canal pour le test de natation

Entraînement : Des souris n'ayant jamais nagé auparavant ont été soumises à 5 jours d'entraînement. Les deux premiers jours, les animaux nagent 5 fois sans charge, les trois jours suivants, 5 fois avec charge, 5 fois sans charge, alternativement. La corrélation des rangs selon Spearman [9] s'est révélée significative pour chacun des entraînements. Cela signifie que chaque souris garde le même rang pendant les 5 jours d'entraînement.

Le test : Immédiatement après l'exposition, les animaux sont jetés à l'eau à l'extrémité du canal. Ils trouvent à l'autre extrémité une rampe leur permettant de sortir de l'eau. Chaque animal nage 10 fois : 5 fois sans charge, 5 fois avec charge, alternativement. Ce test est exécuté deux fois par semaine.

3.3.2. Mortalité chronique

Les souris sont exposées à des concentrations croissantes 2 fois 5 jours, 6 heures par jour. Nous avons tenu compte des souris mortes dans l'intervalle de 24 heures après le début de l'exposition.

3.3.3. Mortalité aiguë

Des animaux répartis en plusieurs sous-groupes sont exposés chacun pendant 6 heures à une concentration donnée. Nous avons également tenu compte des souris mortes dans l'intervalle de 24 heures après le début de l'exposition.

3.3.4. Poids corporel

Dans le cadre des essais chroniques, nous avons pesé une fois par semaine (chaque fois le quatrième jour) les souris exposées et les souris contrôle. Les souris entraînées à la natation sont pesées individuellement, les souris non entraînées sont pesées en groupes.

3.3.5. Tolérance

En toxicologie, on comprend sous le terme de "tolérance", un effet de protection contre des expositions à des concentrations mortelles. Cette protection est provoquée par des expositions préalables à des concentrations subléthales.

Nos animaux sont exposés une première fois à une faible concentration de la substance étudiée, puis, à des intervalles variant de 2 à 10 jours, ils sont exposés une seconde fois à une concentration léthale.

3.3.6. Analyse histologique

Dans le cadre des expositions chroniques, des souris exposées et des souris contrôle ont été sacrifiées après la dernière exposition. Les poumons et les trachées prélevés et conservés dans la formoline 4 % ont été envoyés pour l'analyse histologique à l' "Institut für industrielle und biologische Forschung" à Cologne.

3.4. Analyse statistique [9]

3.4.1. Test de natation

Nous avons analysé nos résultats à l'aide des tests de statistique suivants:

L'analyse de variance. Nous avons déterminé l'influence de certains facteurs intervenant dans une expérience ainsi que leurs interactions. L'importance de l'influence a été contrôlée à l'aide du test F.

Le test de Student et le test de Duncan. Ces deux tests ont été utilisés pour une analyse plus détaillée des résultats. Ils permettent de contrôler la signification des différences entre les niveaux (levels) des facteurs d'influence.

Nous avons appliqué le test de Student au cas de deux niveaux, le test de Duncan au cas de plus de deux niveaux, bien que leurs bases théoriques ne soient pas absolument identiques.

Le test F subséquent à l'analyse de variance, le test de Student, et le test de Duncan, reposent tout les trois sur l'hypothèse de la distribution normale.

Nous appuyant sur les conclusions de van der Waerden [64], nous n'avons pas contrôlé la normalité de nos résultats expérimentaux.

La corrélation des rangs selon Spearman. Les corrélations ont été calculées selon la méthode de Spearman. Elle présente l'avantage de ne pas être soumise à des restrictions dues à la distribution des résultats.

3.4.2. Mortalité

Nous avons calculé la concentration létale pour 50 % des animaux (LC_{50}) par la méthode de Behrens.

3.4.3. Poids corporel

Le test de Wilcoxon pour échantillons non groupés a été employé pour déterminer s'il y avait ou non une différence significative entre les

poids des animaux exposés et ceux des animaux contrôle pendant la durée des expériences.

Ce test présente lui aussi l'avantage de n'être soumis à aucune restriction quant à la distribution des résultats.

4. Dioxyde d'azote

4.1. Propriétés physico-chimiques

Le dioxyde d'azote est un gaz brun-rouge, d'odeur âcre, provoquant de fortes irritations nasales et oculaires.

formule chimique	NO_2
poids moléculaire	46,01
point de fusion	-9,3 °C
point d'ébullition	21,3 °C
densité de vapeur (air : 1)	1,449 à 20 °C
facteurs de conversion	1 ppm (vapeur) = 1,88 mg/m ³ 1 mg/l (vapeur) = 532 ppm

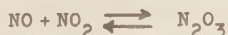
NO_2 réagit avec l'eau et forme un mélange d'acide nitrique (HNO_3) et d'acide nitreux (HNO_2). Cette réaction a également lieu quand NO_2 entre en contact avec l'air alvéolaire saturé ou le mucus protégeant les voies respiratoires.

Sa formule à l'état liquide est N_2O_4 (peroxyde d'azote). Mais dès le point d'ébullition (21,3 °C), ce dimère est partiellement dissocié en molécules NO_2 . Cette dissociation, qui est d'autant plus importante que la température est plus élevée, est totale à 220 °C sous la pression atmosphérique. Vers 500 °C une nouvelle dissociation apparaît avec formation d'oxygène et de monoxyde d'azote, ce dernier réagissant lui-même partiellement avec NO_2 pour donner N_2O_3 .

A la température ordinaire, NO (monoxyde d'azote) s'oxyde en présence d'air en donnant naissance à du dioxyde d'azote NO_2 :



Une partie du dioxyde formé réagit en fait sur l'oxyde résiduel pour donner l'anhydride nitreux N_2O_3 selon une réaction équilibrée :



Le mélange gazeux obtenu, dont la constitution varie avec les conditions physiques, porte le nom de vapeurs nitreuses.

Dans l'industrie, la limite tolérable (threshold limit value) a été fixée à 5 ppm NO_2 .

4.2. Effets pathogènes chez l'homme

L'acide nitrique utilisé dans l'industrie, les gaz de combat, et les incendies de dépôts de fils, provoquent de nombreux accidents et maladies dus à l'intoxication par des gaz nitreux [36, 38].

Examen clinique

L'inhalation de gaz nitreux provoque la toux, des irritations de la gorge, un sentiment d'étouffement, des vertiges, des maux de tête, et des vomissements.

Les symptômes graves: insuffisance cardiaque, chute de pression, cyanose, pouls rapide, et crampes apparaissent souvent 2 à 36 heures après l'exposition aux gaz. 50 % des malades meurent en 24 heures, 7 % après trois jours [41]. Les causes de décès sont généralement une insuffisance du cœur droit et des troubles circulatoires.

Hasegawa [36] s'expose lui-même afin de décrire les symptômes d'une intoxication au NO_2 . Voici en résumé ses observations:

- 1) inhalation de 64 ppm pendant une heure: Odeur peu supportable, larynx irrité, respiration rapide et superficielle.
- 2) inhalation de 100 ppm pendant environ deux heures: toux, irritation de la glotte. 40 minutes après le début de l'expérience, la fréquence cardiaque est de 92 battements par minute.
- 3) inhalation de 207 ppm pendant 10 minutes: larmes, brûlures de la glotte et des muqueuses nasales, étouffements, vertiges et vomissements.

Sept heures après la fin de l'exposition, Hasegawa ne ressentait plus aucun malaise.

Henschler [42] observe que 20 ppm inhalés pendant deux heures provoquent une augmentation limite du taux normal de méthémoglobine.

Le seuil olfactif limite pour NO_2 varie de 0,1 à 0,4 ppm. Ce gaz est reconnu avec certitude à partir de 4 ppm [37].

Patty [39] et le Hygienic guide serie [40] prescrivent 5 ppm comme seuil olfactif limite.

Le seuil d'irritation, c'est-à-dire la concentration qui, chez une personne non habituée au NO_2 , irrite les yeux et les voies respiratoires, est fixée entre 20 et 30 ppm [37].

4.3. Toxicologie

De nombreuses expériences quantitatives furent faites pour déterminer la toxicité des oxydes d'azote. D'après ces expériences, nous voyons que chaque espèce animale réagit différemment. Les chiens présentent

de faibles symptômes d'intoxication aux concentrations qui provoquent chez les rats des oedèmes pulmonaires [11].

Gray [12] observe que les animaux adultes sont plus résistants que les jeunes animaux, et que les mâles sont plus résistants que les femelles.

Gray [13] et Haydon [14] s'accordent pour souligner l'importante dispersion existant entre animaux de même espèce. Il semble que l'âge, la diète, les différences génétiques, et le fait de grouper plusieurs animaux dans une même cage, augmentent leur sensibilité au NO_2 .

Les nombreuses expériences à exposition unique sont résumées dans le tableau 2. Dans ce dernier, nous voyons que les temps d'exposition varient de 5 minutes à 20 heures, et les concentrations de 7 ppm à 244,5 ppm.

La mortalité observée est due particulièrement à des lésions pulmonaires: oedèmes et inflammations interstitielles, vasodilatations, hémorragies et hyperhémies [11, 23, 24, 26].

Des cobayes exposés à 30 ppm pendant une heure, développent des oedèmes pulmonaires et des congestions. Leur taux d'hémoglobine est plus élevé que la normale [18].

80 % des souris exposées pendant 6 heures à 80 ppm meurent d'oedèmes pulmonaires, tandis que des souris exposées pendant 6 heures à 40 ppm ne présentent qu'un faible oedème [22].

Murphy [17] a observé chez des souris exposées au NO_2 pendant 6 heures l'effet de l'inhalation sur l'activité motrice spontanée dans une roue. Si l'activité motrice des animaux contrôle est normée à 100 %, l'activité spontanée chez les animaux exposés est:

120 %	pour	3,7 ppm
80 %	pour	7,7 ppm
60 %	pour	14,3 ppm
17 %	pour	20,9 ppm

L'activité motrice spontanée diminue quand la concentration de NO_2 augmente. Une concentration de 1 ppm de NO_2 peut, en une heure déjà, provoquer chez des rats la rupture de cellules et l'écoulement de liquide cytoplasmique dans les tissus interstitiels des poumons, preuve d'un début d'inflammation [27].

L'inhalation chronique et aiguë de NO_2 provoque une augmentation des taux d'aldolase et de déshydrogénase lactique [28].

Le tableau 3 rassemble des résultats d'exposition chroniques.

Les symptômes d'intoxication dus à des expositions chroniques sont identiques à ceux d'expositions aiguës. Le poids corporel de rats exposés à 25 ppm pendant 40 jours environ ne change pas. Seuls les poumons présentent une hyperplasie de l'épithélium bronchial, par contre, les rats exposés à 25 ppm pendant environ 150 jours diminuent de poids, présentent des proliférations de tissus fibreux dans les conduits alvéolaires et une congestion vasculaire. La fréquence respiratoire est de 90 battements par minute pour les animaux exposés, et de 40 battements par minute pour les animaux contrôle [31].

Les expériences de Wagner [25] et de Haydon [14] corroborent celles de Freeman [31] et nous apprennent que les animaux soustraits au NO₂ regagnent rapidement du poids, mais gardent une fréquence respiratoire légèrement plus élevée que celle des animaux contrôle.

A l'aide du tableau 3, on peut tirer les conclusions suivantes:

Une exposition interrompue et de longue durée provoque des lésions moindres qu'une exposition ininterrompue et de courte durée. Ceci est valable aussi bien pour des concentrations élevées que pour de faibles concentrations. Par exemple, Wagner [25] n'a enregistré aucune mortalité chez les souris exposées pendant 18 mois, 6 heures par jour, à 25 ppm. Freeman [31] lui, a trouvé que trois animaux sur 6 meurent pendant les mois d'exposition ininterrompue à 25 ppm.

Il existe entre Tollman [33] et Freeman [31] une discrédance semblable. tous deux exposent des rats à 100, respectivement 107 ppm et enregistrent 100 % de mortalité, mais Tollmann expose ses rats 6 heures par jour pendant 4 mois, et Freeman ne les expose que pendant 24 heures.

Tableau 2 : La toxicité du NO₂ lors d'expositions uniques (toxicité aiguë).

auteurs	animaux	conc. (ppm)	durée de l'exposition	mortalité	observations
Gray [13,29]	rats rats	— —	30 min. 240 min.	LC ₅₀ = 138 ppm LC ₅₀ = 67 ppm	oedème pulmonaire oedème pulmonaire
Carson [11]	rats rats rats rats rats rats rats rats rats rats rats rats	— — — — 190 90 72 28 104 65 74 33	5 min. 15 min. 30 min. 60 min. 5 min. 15 min. 60 min. 60 min. 5 min. 15 min. 5 min. 15 min.	LC ₅₀ = 416 ppm LC ₅₀ = 201 ppm LC ₅₀ = 162 ppm LC ₅₀ = 115 ppm 0 0 0 0 0 0 0 0	— — — — dyspnée, irritation oculaire dyspnée, irritation oculaire dyspnée, irritation oculaire faible irritation nasale dyspnée pendant l'exposition dyspnée pendant l'exposition — —
Ehrlich [15]	souris	25	2 heures	0	oedème pulmonaire, dilatation des capillaires et des veines pulmonaires
Murphy [16]	rats rats	31 27	4 heures 20 heures	0 0	augmentation du taux des phosphatases idem [alcalines du foie
Murphy [17]	souris cobayes cobayes	7,7 13 et 9 6,5 et 5	6 heures 2 heures 4 heures	0 0 0	diminution de l'activité motrice spontanée dans la roue augmentation de la fréquence respiratoire et diminution du volume respiratoire. idem
Buckley [18]	cobayes cobayes	30 à 100 30	60 min. 60 min.	100 % 100 %	oedème pulmonaire oedème pulmonaire
Wagner [25]	souris souris	60 70	5 heures 5 heures	64 % 29 %	— —
Dumont [19]	souris		30 min.	LC ₅₀ = 108 ppm	—
Steadman [20]	rats cobayes	60 60	8 heures 8 heures	6 sur 15 13 sur 15	— —
Studier [21]	souris souris	52 52	6 heures 6 heures	3 sur 10 (dans l'air humide) 7 sur 10 (dans l'air sec)	—
V.D.I. [22]	souris souris souris souris souris	10 20 40 60 80	6 heures 6 heures 6 heures 6 heures 6 heures	0 0 0 50 % 80 %	pas d'oedème pulmonaire faible oedème pulmonaire faible oedème pulmonaire oedème pulmonaire oedème pulmonaire
Diggle [23]	rats	42,5	4 heures	0	—
Pfitzer [24]	rats	119	4 heures	50 %	oedème pulmonaire

Tableau 3 : Toxicité du NO₂ lors d'expositions répétées et continues (toxicité chronique).

auteurs	animaux	conc.(ppm)	durée de l'expo.	mortalité	observations
Gray [26]	rats	9-14 **	10-24 jours	0	emphysème, pneumonie, inflammations
Gray [29]	rats	4 **	6 mois	0	_____
	souris	4 **	6 mois	0	_____
	cobayes	4 **	6 mois	0	_____
Ripperton [30]	rats	0,5 *	2-6 semaines	0	changement du taux des catalases du sang, augm.des acides glutamique et aspartique.
Freeman [31]	rats	12,5 *	213 jours	1 sur 9	hyperplasie épithéliale des bronches et des bronchioles, congestion vasculaire, fréquence respiratoire plus élevée que la normale.
	rats	25 *	157 jours	3 sur 6	
	rats	50 *	20 jours	1 sur 9	pneumonie aiguë
	rats	50 *	68 jours	6 sur 8	
	rats	100 *	24 heures	100 %	oedème pulmonaire
Balchum [32]	cobayes	15 **	10 mois	0	_____
Buckley [18]	cobayes	15 *	10 semaines	0	_____
Tollman [33]	cobayes	107 **	7,5 mois	67 %	_____
	rats	107 **	17 semaines	100 %	_____
	cobayes	125 **	7,5 mois	92 %	_____
	rats	125 **	17 semaines	100 %	_____
Wagner [25]	rats, souris	1-25 **	12 à 18 mois	0	_____
	hamsters, cobayes	1-25 **	12 à 18 mois	0	_____
	chiens, lapins	1-25 **	12 à 18 mois	0	_____
Haydon [14]	rats	0,8 *	255 à 786 jours	0	augmentation de la ventilation pulmonaire, diminution du poids corporel, fréquence respiratoire élevée, alvéoles distendues.
	rats	4 *	16 semaines	0	
	rats	12 *	20 à 43 jours	0	
Freeman [34]	rats	0,8 *	durée de vie des animaux	0	augmentation de la ventilation pulmonaire
Steadman [20]	rats	0,5 *	30 à 90 jours	7 %	_____
	rats	5 *	30 à 90 jours	0	_____
	rats	12 *	30 jours	16 %	_____
	rats	12 *	60 jours	33 %	_____
	rats	12 *	90 jours	37 %	_____
	cobayes	0,5 *	30 à 90 jours	0	_____
	cobayes	5 *	30 à 90 jours	13 %	_____
	cobayes	12 *	30 jours	7 %	bronchite, bronchopneumonie
	cobayes	12 *	60 jours	49 %	
	cobayes	12 *	90 jours	63 %	
Buckley [28]	cobayes	10 *	12 à 45 jours	0	altération de certains enzymes
Valada [35]	rats	160 *	5 jours	100 %	oedème pulmonaire, méthémoglobine, vasodilatation et hypotension.
	cobayes	160 *	3 jours	100 %	

* expositions ininterrompues

** expositions répétées de 4 à 8 heures par jour

4.4. Méthode

4.4.1. Appareillage

La seringue (1 ml) d'un injecteur automatique rempli de NO_2 liquide pousse continuellement un volume de 0,266 microlitre par minute dans un flux d'air. L'appareillage (fig.2) est monté dans un frigidaire (5°C), car le point d'ébullition du NO_2 est de $21,3^\circ\text{C}$. A la sortie du frigidaire, le NO_2 liquide se vaporise à la température ambiante (en moyenne 25°C), et se mélange à 10-20 litres d'air par minute. Ce mélange entre dans la chambre d'exposition (275 litres) et donne la concentration désirée. Pour chaque concentration différente, on varie la vitesse de l'air et la vitesse du piston.

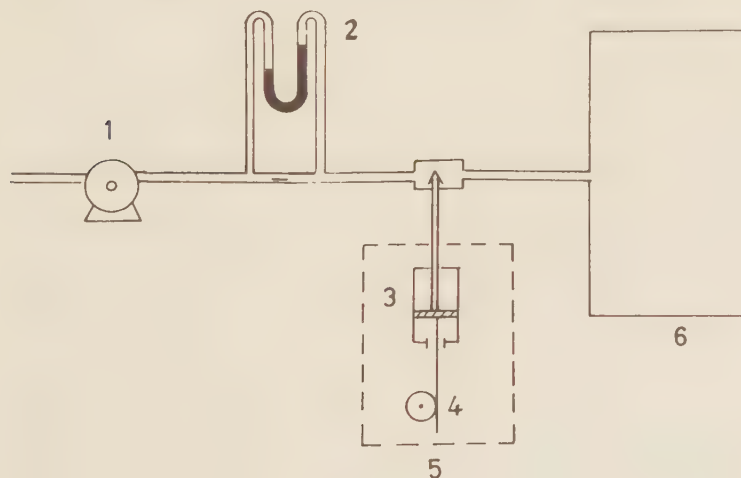


Fig.2 Appareillage pour doser le NO_2

- 1 : pompe avec moteur
- 2 : manomètre
- 3 : seringue à NO_2
- 4 : moteur actionnant le piston
- 5 : frigidaire
- 6 : chambre d'expérimentation

4.4.2. Détermination chimique

La méthode de détermination chimique [45] est basée sur une réaction colorimétrique de l'acide phénoldisulfonique avec tous les oxydes d'azote, à l'exception du N_2O_4 . La méthode permet de déterminer des concentrations de l'ordre de 5 à plusieurs milliers de ppm de NO_2 . La technique est la suivante: on fait le vide dans une bouteille étalonnée de un litre, contenant une solution d'absorption (peroxyde d'azote et acide sulfurique). On connecte cette bouteille par un tube capillaire au tube de sortie de la chambre d'expérimentation, et on laisse lentement entrer l'air chargé de NO_2 . Les oxydes d'azote sont transformés en acide nitrique et ions nitrates. Les ions nitrates réagissent avec l'acide phénoldisulfonique pour donner un composé jaune dont l'intensité est mesurée au spectrophotomètre dans une bande d'absorption à 421μ . Une courbe d'étalonnage établie sur la base d'échantillons connus permet de déterminer le taux de nitrate de notre mélange gazeux.

Les différentes concentrations de NO_2 déterminées à l'aide de cette méthode sont reportées dans le tableau 4, qui contient également les limites de confiance pour chacune des concentrations étudiées.

Tableau 4. Concentrations du NO_2 dans la chambre d'expérimentation

Conc. théoriques (ppm)	Nombres de mesures (n)	Conc. réelles moyennes ($\bar{x}$)	s	Limites de confiance à 95 % ($\bar{x} \pm 2s$)
10	12	9,72	3,32	3,1 - 16,3
20	18	23,2	7,62	8,0 - 38,4
40	13	51,4	8,9	33,6 - 69,2
100	17	86,0	18,7	48,5 - 123,5
200	12	170,7	28,2	114,3 - 227,1

4.4.3. Groupes d'animaux

Pour les diverses expériences, les animaux sont subdivisés en plusieurs groupes:

Groupe 1

Les 90 souris choisies pour les expériences chroniques (test de natation, mortalité chronique, poids corporel, analyse histologique) sont réparties au hasard en quatre sous-groupes:

A : 15 souris entraînées à la natation	exposées
B : 15 souris entraînées à la natation	contrôle
C : 30 souris non entraînées à la natation	exposées
D : 30 souris non entraînées à la natation	contrôle

Groupe 2

Pour l'étude de la mortalité aiguë nous avons réparti un groupe de 230 souris en quatre sous-groupes.

Groupe 3

Pour l'étude de la tolérance, nous avons réparti 160 souris en 8 sous-groupes de 20 animaux chacun.

4.4.4. Test de natation

Nous avons soumis les animaux appartenant aux sous-groupes A et B du groupe 1 au test de natation. Pour le déroulement du test, voir 3.3.1.

4.4.5. Mortalité chronique

Les 45 souris des sous-groupes A et C pesant entre 25 et 30 g, sont exposées aux concentrations théoriques croissantes de 20, 40, 100, et 200 ppm. Les animaux sont exposés à ces concentrations deux fois 5 jours, 6 heures par jour. Les sous-groupes B et D, au total 45 souris, placés dans les mêmes conditions d'expérience, inhalent de l'air frais et servent de contrôle.

4.4.6. Mortalité aiguë

Quatre sous-groupes de souris (groupe 2) pesant de 25 à 40 g sont exposés chacun 6 heures aux concentrations de 20, 40, 100, et 200 ppm. Dans chacune des expériences de toxicité chronique et aiguë, nous avons tenu compte des souris mortes dans l'intervalle de 24 heures après le début de l'exposition.

4.4.7. Poids corporel

Contrairement aux expériences faites avec l'acroléine et avec l'acétaldéhyde, nous avons pesé les animaux exposés et contrôle en groupe au cours de la deuxième semaine d'inhalation à la concentration étudiée. Nous avons ainsi la moyenne des quatre

sous-groupes A, B, C, D. Les animaux du groupe 2 de l'essai chronique complémentaire sont pesés une fois par semaine, également en groupe.

4.4.8. Tolérance

Quatre sous-groupes de 20 animaux (groupe 3) sont exposés une première fois à 20 ppm de NO_2 pendant 6 heures, puis à des intervalles variant de 1 à 10 jours, ils sont exposés une seconde fois à 200 ppm pendant 6 heures.

Quatre sous-groupes de 20 animaux également (groupe 3) servent de contrôle et sont exposés directement à 200 ppm.

4.4.9. Analyse histologique

Dans le cadre des expériences de toxicité chronique, 13 souris survivantes des sous-groupes A et C (groupe 1) ont été sacrifiées quatre semaines après la dernière exposition à 200 ppm de NO_2 . Leurs poumons ont été prélevés et conservés dans de la formaline à 4 %. 11 souris contrôle des sous-groupes B et D (groupe 1), du même âge mais non exposées, ont été sacrifiées en même temps. Les poumons ont été envoyés pour l'analyse histologique à l' "Institut für industrielle und biologische Forschung" à Cologne.

4.5. Résultats

4.5.1. Test de natation

Les tests de natation se sont déroulés deux fois par semaine, pendant les quatre expositions de 15 jours chacune, aux concentrations croissantes de 20, 40, 100, et 200 ppm. Les moyennes des temps de natation sont représentées dans la figure 3. A partir de 40 ppm, on constate que les souris exposées nagent plus lentement que les souris contrôle. Pour les courses avec charge, les différences entre les temps de natation correspondants sont plus marquées que pour les courses sans charge. D'après le test de Student, la différence entre ces temps de natation devient significative à 100 ppm et à 200 ppm, ceci pour les deux tests (avec et sans charge).

Nous n'avons pas seulement considéré les moyennes des temps de natation sur les courses avec et sans charge, mais aussi l'évolution de ces temps d'une course à la suivante.

La figure 4 représente cette évolution pour chaque groupe (exposé ou contrôle), pour chaque test (avec ou sans charge), et pour chaque concentration. D'une façon générale, nous assistons à un ralentissement d'une course à la suivante. Ce phénomène de fatigue se traduit par le fait que chaque courbe de la figure 4 est monotone croissante. On voit aussi que les souris exposées se fatiguent plus vite que les souris contrôle (les courbes en traits pleins ont une pente plus forte que les courbes pointillées correspondantes). Cette tendance s'accroît d'ailleurs avec la concentration, et est plus marquée pour les courses avec charge que pour les courses sans charge.

Remarquons encore que si on compare entre elles les courses de même numéro, on constate une amélioration des temps de natation pour les souris contrôle (avec ou sans charge). Cela correspond bien à un phénomène d'entraînement. Par contre, on assiste à une détérioration de ces mêmes temps pour les souris soumises à des concentrations croissantes de NO_2 . Sur la figure 4, ces deux phénomènes sont mis en évidence pour les troisièmes courses.

L'ensemble des résultats des tests de natation a été soumis à l'analyse de variance. Sur la base des résultats de l'analyse de variance, nous avons analysé les temps pour chacune des 5 courses à l'aide du test de Duncan. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 6. Pour l'exposition à 40 ppm, nous constatons que les deux dernières courses avec charge sont significatives par rapport aux courses des animaux contrôle. A 100 ppm, c'est même le cas pour les trois dernières courses. A 200 ppm, toutes les courses sont significatives, à l'exception de la seconde. Ces différences significatives sont également indiquées sur la figure 4 par une ou deux astérisques.

Le test de Duncan nous permet également d'étudier la signification des temps de natation pour chaque jour de test (tableau 7). Nous constatons que pour l'exposition à 40 ppm, seuls les temps de natation du quatrième jour de test (c'est-à-dire le douzième jour de l'exposition à 40 ppm) sont significatifs. Par contre, tous les temps de natation pour l'exposition à 100 et à 200 ppm sont significatifs. Nous avons soumis les temps de natation des souris exposées et contrôle au test de Spearman pour voir si les souris gardaient le même rang.

Dans le tableau 9, nous voyons que, chez les souris contrôle, l'ordre des rangs reste significativement le même pendant toute la durée de l'expérience. Nous remarquons dans le tableau 8 que chez les souris exposées, l'ordre des rangs reste significatif pour les étapes de 20 à 40 ppm et de 40 à 100 ppm. Par contre, l'ordre des rangs à 200 ppm s'est modifié.

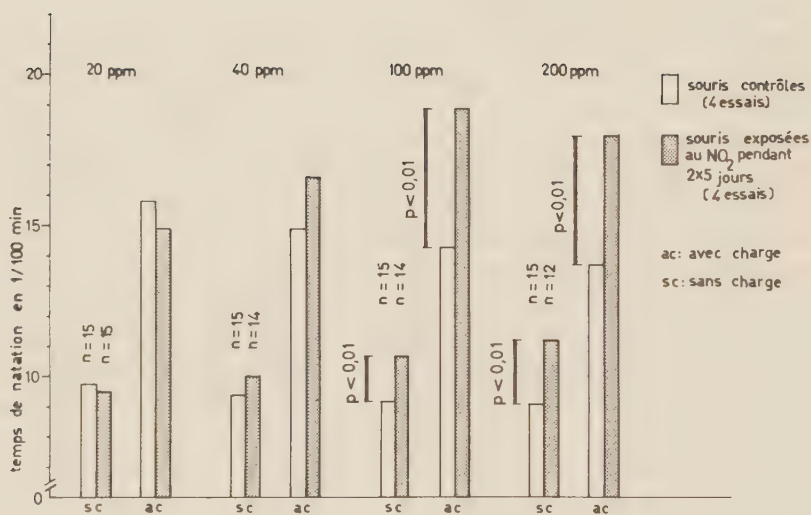


Fig.3 Effets du NO₂ sur les temps de natation

Chaque colonne représente la moyenne de quatre essais de natation réalisés pendant une période de deux semaines. (test de Student)

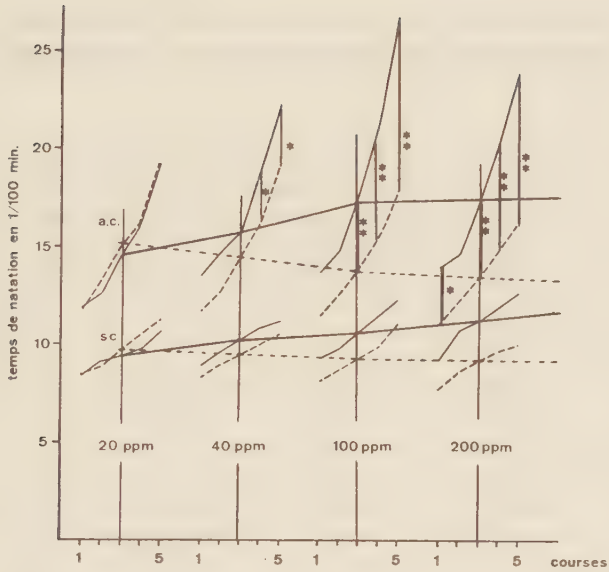


Fig.4 Évolution des temps de natation d'une course à la suivante

a.c. : avec charge
s.c. : sans charge
— : souris exposées
----- : souris contrôle
* : $p < 0,05$
* : $p < 0,01$

Tableau 5. Analyse de variance des temps de natation

sources de variation	degrés de liberté	produits des carrés	valeurs de F	p
courses	4	157,20	51,86	< 0,01
jours	3	2,90	0,95	> 0,05
poids	1	2568,68	847,415	< 0,01
concentr.	3	9,24	3,05	< 0,05
groupes	1	27,56	90,33	< 0,01

Tableau 6. Moyennes des temps de natation des 5 courses avec et sans charge lors des expositions à 20, 40, 100, et 200 ppm de NO₂

		temps de natation (indiqués en l/100 min.) des animaux:			
Conc. (ppm)	courses no.	exposés sans charge	contrôle sans charge	exposés avec charge	contrôle avec charge
20	1	8,39	8,45	11,88	11,77
	2	9,08	8,89	12,61	13,18
	3	9,42	9,71	14,45	15,13
	4	9,78	10,42	16,11	16,11
	5	10,73	11,25	19,24	19,24
40	1	8,92	8,28	13,46	11,74
	2	9,59	8,96	14,72	12,84
	3	10,30	9,40	15,84	14,59
	4	10,86	9,97	19,00 *	16,25
	5	12,18	10,50	22,24 *	19,32
100	1	9,25	8,13	13,71	11,53
	2	9,76	8,73	14,79	12,55
	3	10,69	9,37	17,82 **	13,93
	4	11,46	9,85	21,50 **	15,46
	5	12,33	10,58	26,86 **	17,92
200	1	9,33	7,82	14,02 *	11,13
	2	10,75	8,73	14,71	12,32
	3	11,25	9,28	17,32 **	13,42
	4	11,95	9,79	20,29 **	14,94
	5	12,68	10,12	23,85 **	16,20

Les astérisques signalent des valeurs significativement différentes (test de Duncan) par rapport aux valeurs contrôle correspondantes.

* : p < 0,05

** : p < 0,01

Tableau 7. Moyennes des temps de natation pour chaque jour de test
lors des expositions à 20, 40, 100, 200 ppm de NO₂.

		temps de natation (indiqués en l/100 min.) des animaux:			
conc. (ppm)	jours de test	exposés sans charge	contrôle sans charge	exposés avec charge	contrôle avec charge
20	2	8,95	9,40	13,90	14,09
	5	9,27	9,88	14,30	15,67
	9	9,75	9,92	15,80	16,09
	12	9,68	9,77	15,40	17,40
40	2	10,40	9,20	16,04	14,40
	5	10,30	9,50	16,27	14,82
	9	9,82	9,48	16,80	14,78
	12	11,10	9,48	18,92 **	15,72
100	2	11,38	9,50	24,00 **	14,95
	5	10,23	9,60	17,32 *	14,82
	9	10,52	9,22	17,75 **	13,92
	12	10,64	8,98	16,60 **	13,40
200	2	11,18	9,20	18,80 **	14,20
	5	11,18	9,02	19,20 **	13,22
	9	10,20	9,10	15,70 *	13,20
	12	11,87 *	9,12	18,59 **	13,67

Les astérisques signalent des valeurs significativement différentes
(test de Duncan) par rapport aux valeurs contrôle correspondantes.

* : p < 0,05

** : p < 0,01

Tableau 8. Coefficients de corrélation R des rangs selon Spearman pour les tests de natation des souris exposées au NO₂. (n = 12)

ppm \ ppm	20	40	100	200
20		0,601 *	0,426	0,300
40			0,888 *	0,426
100				0,489

* : résultats significatifs (p < 0,05)

Tableau 9. Coefficients de corrélation R des rangs selon Spearman pour les tests de natation des souris contrôle. (n = 15)

ppm \ ppm	0	0	0	0
0		0,846 *	0,660 *	0,742 *
0			0,725 *	0,805 *
0				0,846 *

* : résultats significatifs (p < 0,05)

4.5.2. Mortalité lors de l'exposition chronique

Parallèlement aux résultats du test de natation (4.5.1.), nous avons étudié l'évolution de la mortalité. Dans le groupe 1 des animaux exposés, nous avons 15 souris entraînées à la natation (sous-groupe A) et 30 souris non entraînées (sous-groupe C). Les résultats de la mortalité sont rapportés dans le tableau 10. Nous constatons qu'une souris est morte lors de l'exposition à 40 ppm de NO₂, une autre lors de l'exposition à 100 ppm, et deux souris lors de l'exposition à 200 ppm. Il y a donc eu chez les animaux exposés 4 souris sur 45 qui sont mortes, et, chez les souris contrôle, 1 souris sur 45. Ces résultats ne nous permettent pas de calculer une LC₅₀ selon Behrens.

Tableau 10. Mortalité lors de l'exposition chronique

concentrations de NO ₂ (ppm)	nombre de souris exposées	mortalité	mortalité en %
20	45	0	0
40	45	1	2,2
100	44	1	2,3
200	43	2	4,6

Mortalité chez les souris contrôle (inhalant de l'air frais):

nombre de souris contrôle	mortalité	mortalité en %
45	0	0
45	0	0
45	1	2,2
44	0	0

4.5.3. Mortalité lors de l'exposition de toxicité aiguë

230 souris réparties en 4 sous-groupes sont exposées pendant 6 heures à différentes concentrations de NO₂. Les résultats sont rapportés dans le tableau 11. Alors que nous n'observons aucune mortalité pour les expositions à 20 et à 40 ppm, nous enregistrons à 100 ppm une mortalité de 22 % et à 200 ppm une mortalité de 92 %. Sur la base de ces résultats, nous avons calculé une LC₅₀ aiguë approximative de 140 ppm pour une exposition de 6 heures.

Tableau 11 . Mortalité enregistrée pendant l'exposition aiguë
(durée d'exposition: 6 heures pour chaque concentration)

concentrations de NO ₂ (ppm)	nombres de souris exposées	nombres de souris mortes	mortalité en %
20	30	0	0
40	45	0	0
100	105	23	22
200	50	46	92

La LC₅₀ aiguë calculée selon Behrens est de 140 ppm.

4.5.4. Poids corporel

Dans le cadre des expériences chroniques, les sous-groupes A, B, C, D du groupe 1 furent pesés à la fin de chacune des périodes d'exposition aux concentrations croissantes de NO₂. Nous avons ainsi le poids moyen des quatre sous-groupes. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 12 et la figure 5. Nous voyons que les souris exposées et entraînées à la natation (sous-groupe A) ont un poids moyen égal à celui des souris contrôle entraînées (sous-groupe B), ceci tout au long des 8 semaines d'expérience. Nous constatons également que les souris non-entraînées à la natation, qu'elles appartiennent aux animaux exposés (sous-groupe C) ou contrôle (sous-groupe D), ont un poids moyen inférieur à celui des animaux entraînés aussi bien exposés que contrôle pendant les 8 semaines d'exposition. Remarquons encore que le sous-groupe C à un poids moyen supérieur à celui du sous-groupe D. A ce sujet, il faut signaler que les souris du sous-groupe D, et, dans une moindre mesure, les animaux du sous-groupe C ont souffert, dès la première semaine d'expérience, de morsures et plus tard d'infections à la queue et dans la région dorsale.

Tableau 12 . Evolution des poids corporels des souris exposées au NO₂
et soumises deux fois par semaine au test de natation.

semaine	groupes	nombres de souris	conc. de NO ₂ (ppm)	poids moyens (en grammes)
0	A (exposé)	15	--	34,0
	B (contrôle)	15	--	33,5
2	A	15	20	36,4
	B	15	--	36,6
4	A	15	40	39,1
	B	15	--	40,5
6	A	14	100	40,3
	B	15	--	40,7
8	A	12	200	41,9
	B	15	--	41,5

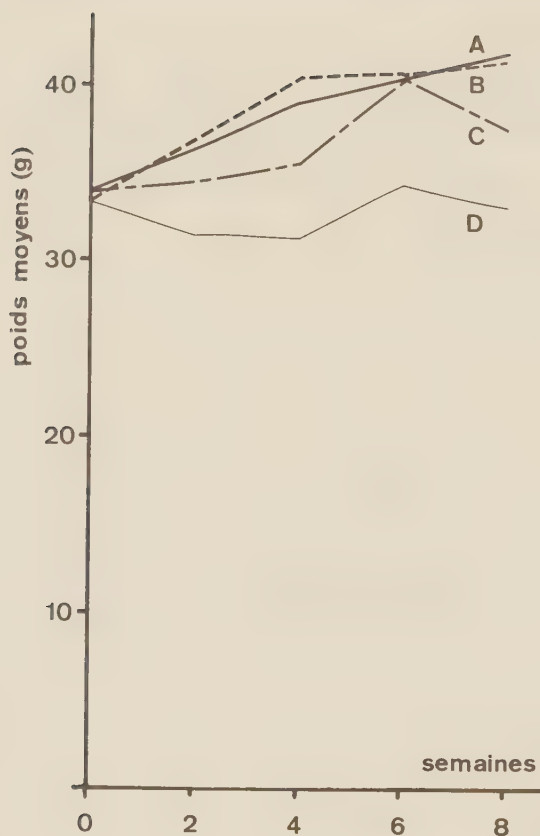


Fig.5 Poids corporel des animaux contrôle et exposés

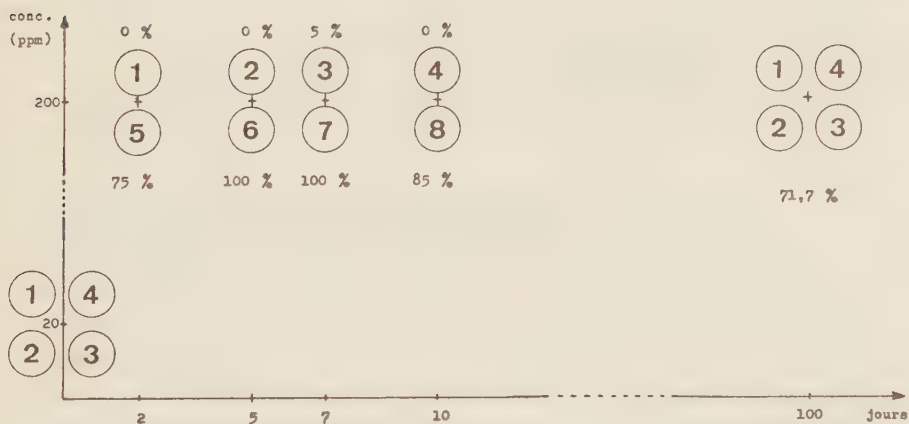
- A : souris exposées entraînées à la natation
- B : souris contrôle entraînées à la natation
- C : souris exposées non entraînées à la natation
- D : souris contrôle non entraînées à la natation

4.4.5. Tolérance

La comparaison entre le faible taux de mortalité dû à l'exposition chronique et les taux de mortalité dus aux expositions aiguës nous a incité à entreprendre une étude sur la tolérance .

Dans ce but , nous avons réparti les 160 souris du groupe 3 en 8 sous-groupes de 20 souris chacun . Ceux-ci subissent des expositions de 6 heures à 20 ppm ou à 200 ppm selon le plan décrit au paragraphe 4.4.8., et que nous reproduisons dans le tableau 13 . Les taux de mortalité enregistrés au cours des différentes expositions sont également indiqués dans le tableau 13 .

Tableau 13. Taux de mortalité enregistrés au cours des expériences relatives à la tolérance



Lors des expositions à 200 ppm , on constate que les taux de mortalité sont faibles (de 0 à 5 %) pour les sous-groupes 1 , 2 , 3 , 4 , qui ont subi une exposition préliminaire à 20 ppm dans les 10 jours précédents , et forts (de 75 à 100 %) pour les sous-groupes 5 , 6 , 7 , 8 , qui n'ont pas subi d'exposition préliminaire .

Lors d'une réexposition à 200 ppm des sous-groupes 1 , 2 , 3 , 4 après 100 jours , le taux de mortalité enregistré (71,7 %) est comparable à ceux des sous-groupes 5 , 6 , 7 , 8 .

On en déduit que les souris développent une très forte tolérance à l'égard du NO_2 , qui persiste une dizaine de jours au moins , et qui s'efface après une centaine de jours .

4.5.6. Analyse histologique

Les coupes histologiques colorées à l'hématoxyline éosine ont donné les résultats rassemblés dans le tableau 14.

Chez les souris exposées, nous voyons que 3 souris sur 13 ne présentent aucune anomalie particulière, 4 ont des macrophages alvéolaires, et chez 6 souris, on constate un ou plusieurs épaississements des septa alvéolaires. Les macrophages alvéolaires peuvent également apparaître chez les souris contrôle. Ils ne sont donc pas imputables à l'exposition au NO_2 . Par contre, l'épaississement des septa, qu'on ne décèle que chez les animaux exposés, peut être attribué au NO_2 .

Il faut noter qu'il y a eu quatre semaines d'inhalation d'air frais entre la fin de l'exposition et l'autopsie, quatre semaines pendant lesquelles les lésions réversibles dues au NO_2 ont pu diminuer ou se résorber.

Tableau 14 . Résultats histologiques des poumons des souris exposées au NO_2 .

	nombres de souris examinées	macrophages alvéolaires	épaississements des septa alvéolaires	sans anomalies particulières
souris exposées	13	4	6	3
souris contrôle	11	-	-	11

4.6. Discussion

4.6.1. Test de natation

Lors de l'exposition à 20 ppm nous n'avons décelé ni diminution des performances physiques, ni fatigabilité, mais nous avons constaté une tendance au ralentissement à 40 ppm pour les courses avec et sans charge, ralentissement qui s'avérait significatif à 100 et 200 ppm. On peut conclure que l'effet du NO_2 est d'autant plus fort que la performance exigée est plus grande.

Nos résultats révèlent une diminution de la capacité physique pour une performance de natation enregistrée directement après l'inhalation de NO_2 . Les résultats ne nous permettent pas de localiser le lieu d'impact du NO_2 . Cependant, si l'on tient compte des résultats des analyses histologiques, il y a lieu de penser que les effets du NO_2 portent avant tout sur les fonctions respiratoires.

L'analyse statistique a montré que l'ordre des rangs reste significativement le même lors des expériences à 20, 40, et 100 ppm. Par contre à 200 ppm, les rangs sont modifiés. Ceci signifie que l'effet du NO_2 agit d'une manière uniforme sur les souris tant que les expositions ne dépassent pas 100 ppm. Par contre, à 200 ppm, la sensibilité au NO_2 varie d'un animal à l'autre.

Murphy [17] constate déjà une réduction de l'activité spontanée des souris après une exposition unique à 7,7 ppm. Il faut remarquer que dans nos expériences, à l'encontre de celles de Murphy, les tests de natation ont lieu après l'exposition au NO_2 . Malgré ces différences de méthodes et de résultats, nous pouvons supposer que la diminution de l'activité spontanée dans les expériences de Murphy [17] ne résulte pas d'une réduction de la capacité physique, mais plutôt d'une baisse de la motivation.

4.6.2. Mortalité lors de l'exposition chronique

L'exposition chronique à 20, 40, 100, et 200 ppm ne provoque qu'une mortalité faible et accidentelle, de telle sorte que nous ne pouvons calculer une LC_{50} chronique. Gray [29] et Wagner [25] n'ont pas enregistré de mortalité lors de leurs expositions chroniques variant de 1 à 25 ppm et qui duraient de 6 à 8 mois. En prenant connaissance des résultats de tolérance (voir 4.6.5.), nous n'avons pas été étonnés de n'avoir enregistré aucune mortalité lors des expositions chroniques.

4.6.3. Mortalité lors de l'exposition aiguë

Sur la base des expositions aiguës à 20, 40, 100, et 200 ppm, nous avons calculé une LC_{50} aiguë de 140 ppm. Nos résultats ne correspondent pas très bien avec ceux trouvés dans la littérature.

Hahn [43] n'enregistre pas de mortalité à 20 et à 40 ppm, par contre, il enregistre la mort de 50 % des animaux à 60 ppm, et 80 % à 80 ppm. D'après ces résultats, la LC_{50} se situerait à environ 60 ppm, valeur très inférieure à la nôtre.

Studier [21] a exposé des souris à 52 ppm de NO_2 dans l'air humide et dans l'air sec pendant 6 heures. Les résultats sont les suivants: 3 sur 10 souris meurent dans l'air humide et 7 sur 10 dans l'air sec. Dumont [19] obtient une LC_{50} de 103 à 108 ppm pour 30 minutes d'exposition.

Nous obtenons une mortalité de 22 % pour 6 heures d'exposition à 100 ppm, et une mortalité de 92 % lors d'une exposition de 6 heures à 200 ppm. Ceci ne s'accorde pas avec les résultats de Studier [21]. Dans tous les cas, la mortalité aiguë trouvée par Studier est plus proche de celle trouvée par Hahn [43] ($\text{LC}_{50} = 60$ ppm) que de la nôtre. Les résultats de Wagner [25] montrent que 64 % des souris meurent pendant une exposition de 5 heures à 60 ppm.

La valeur que nous avons déterminée pour la LC_{50} est donc beaucoup plus élevée que les valeurs correspondantes obtenues par d'autres auteurs. Il nous est impossible d'expliquer ces différences.

4.6.4. Poids corporel

Nous pouvons conclure que l'exposition chronique au NO_2 n'a aucune influence sur le poids corporel des animaux. La variation du poids corporel n'est donc pas un critère sensible pour déterminer les effets physiologiques dus à l'exposition au NO_2 , à l'encontre du test de natation et de la mortalité aiguë.

Par contre, l'effort physique exigé au cours du test de natation provoque une augmentation de poids corporel aussi bien chez les animaux exposés que chez les animaux contrôle. L'effort physique n'est d'ailleurs pas le seul facteur à avoir eu une influence sur le poids corporel, les animaux non entraînés (exposés et contrôle) se sont battus et mordus pendant la durée des expériences, provoquant ainsi des inflammations qui ont très probablement joué un rôle sur l'évolution du poids corporel. Ces considérations sortent du cadre de notre travail. Cependant, elles ne sont pas dépourvues d'intérêt car elles nous conduisent à conjecturer que les animaux soumis au test de natation présentent moins d'agressivité que les animaux contrôle.

4.6.5. Tolérance

En toxicologie, on appelle "tolérance" un effet de protection contre des expositions à des concentrations mortelles. Cette protection peut, notamment, être provoquée par des expositions préalables à des concentrations subléthales.

Henschler [47,48] et Hahn [43] ont étudié en détail les conditions expérimentales pour la provocation de la tolérance au NO_2 . Ils ont trouvé qu'après une exposition préalable de 6 heures à 40 ppm, la tolérance se développe au cours des 24 heures suivantes, et atteint son maximum en 2 à 5 jours. La tolérance disparaît en grande partie après 10 jours pour devenir minime après 40 jours. Stokinger [46] a exposé des souris à 10 ppm de NO_2 pendant 4 heures et n'a décelé aucune tolérance, par contre, une exposition à 32 ppm donne une tolérance. Wagner [25] a exposé des souris pendant 7 semaines à 5 ppm de NO_2 et, lors d'une exposition ultérieure à 60 ppm, la mortalité a passé de 64 % à 36 %.

Nos expériences nous ont permis de constater qu'une seule exposition préalable à 20 ppm pendant 6 heures provoque une tolérance très forte pendant 10 jours. Le tableau 15 montre que nos résultats correspondent bien aux résultats des autres auteurs. Henschler [47] propose l'explication suivante pour le développement de la tolérance: Selon cet auteur, une exposition préalable au NO_2 provoque une inflammation interstitielle des septa alvéolaires qui s'étend aux capillaires pulmonaires. Le gaz nocif ne peut ainsi diffuser dans les capillaires, bien que l'échange gazeux de O_2 et de CO_2 se poursuive normalement. D'autres hypothèses ont été émises; réaction immunologique (formation d'anticorps), diminution de la respiration (respiration superficielle), et réactions hormonales (au niveau de la thyroïde surtout). De toutes ces hypothèses, celle de Henschler est la plus fondée.

Tableau 15. Tolérance: comparaison des résultats obtenus par divers auteurs

auteurs	expositions préalables		tolérance
	concentrations (ppm)	durées d'exposition	
Henschler [48]	40	6 heures	+
Wagner [25]	5	7 semaines	+
Stokinger [46]	10	4 heures	-
	32	4 heures	+
nos expériences	20	6 heures	+

5. Acétaldéhyde

5.1. Propriétés physico-chimiques

L'acétaldéhyde est un liquide incolore volatil d'odeur fruitée, âcre, qui irrite les yeux, le nez et la gorge. Il possède deux polymères: le métaldéhyde et le paraldéhyde.

formule chimique	CH_3CHO
poids moléculaire	44,05
poids spécifique	0,788
point de fusion	-123,5 °C
point d'ébullition	21 °C
pression de vapeur	740 mm Hg
densité de vapeur	1,52
facteurs de conversion (760 mm Hg, 25 °C)	1 mg/l = 556 ppm 1 ppm = 1,8 mg/m ³

L'acétaldéhyde est très soluble dans l'eau, l'éther, et dans l'alcool. On emploie l'acétaldéhyde dans la fabrication du plastique, de la résine synthétique, du caoutchouc, dans l'industrie chimique et photographique.

L'acétaldéhyde produite par la combustion de gaz naturels et de carburants est l'un des principaux contaminants de l'atmosphère.

Le seuil de perception olfactive de l'acétaldéhyde se situe à 2,3 ppm [39].

5.2. Effets pathogènes chez l'homme

Le seuil limite d'inhalation de vapeurs d'acétaldéhyde est fixé à 200 ppm pour une journée de travail de 8 heures (MAC). Une concentration 10 fois plus élevée que le seuil limite provoque une irritation des bronches et probablement même des lésions pulmonaires [49].

Fairhall [50] décrit les effets de l'inhalation d'acétaldéhyde comme provoquant des irritations, des narcoses, des bronchites, et des oedèmes pulmonaires, mais ne causant pas d'empoisonnement chronique. Les cas mortels observés sont dus soit à l'anesthésie, soit à un oedème pulmonaire.

Salem [51] rapporte qu'une concentration de 40 ppm provoque chez certaines personnes des éruptions d'urticaire et des crises d'asthme.

L'inhalation d'acétaldéhyde à des concentrations plus élevées entraîne des accès de toux, dyspnée, rhinite, bronchite, tachycardie, conjonctivite, et sueurs nocturnes.

Sim [52] expose 14 personnes à 134 ppm d'acétaldéhyde pendant 30 min. Il ne constate qu'une légère irritation des voies respiratoires.

Les polymères d'acétaldéhyde se dépolymérisent dans le corps humain, donnent de l'acétaldéhyde, et agissent comme anesthésique. Une concentration plus élevée peut entraîner la mort par paralysie du système respiratoire [39].

Selon Wirth [53] l'inhalation chronique d'acétaldéhyde provoque des lésions des vaisseaux sanguins.

L'acétaldéhyde est un métabolite produit par l'oxydation de l'éthanol.

Remarquons que le sang d'une personne en état de sobriété contient 10 μ mol d'acétaldéhyde par litre [56]. Après l'ingestion d'alcool, on mesure dans l'organisme une concentration plus élevée d'acétaldéhyde. Chez les individus traités auparavant à l'antabuse, on trouve une accumulation d'acétaldéhyde [54].

Asmussen [55] perfuse de l'acétaldéhyde (sol. 5 %) dans la veine cubitale de volontaires. Lorsque le taux d'acétaldéhyde atteint 0,7 mg %, il constate une accélération cardiaque et ventilatoire, ainsi qu'une diminution du CO_2 alvéolaire. Ces symptômes sont quantitativement et qualitativement les mêmes que ceux observés chez des personnes pré-traitées à l'antabuse et ingérant ensuite de l'alcool.

L'acétaldéhyde est quantitativement le gaz irritant le plus important de la fumée de cigarette. Sa concentration moyenne serait de 3200 ppm environ [3]. L'analyse chimique quantitative de l'acétaldéhyde contenue dans une cigarette varie selon les auteurs de 0,98 mg à 1,31 mg [57, 1]. Parmi les composés de la fumée de cigarette, l'acétaldéhyde a la plus petite molécule. Les molécules de ce gaz irritant atteignent donc le plus facilement les cellules ciliées des voies respiratoires, et sont peu retenues par les filtres [58].

5.3. Toxicologie

Dans le tableau 16, nous avons rassemblé les différents résultats d'expériences faites sur des animaux. La durée d'exposition varie entre 15 min. et 7 heures. Les concentrations varient également dans des limites très larges: de 250 ppm à 31.700 ppm.

Pour les rats, Skog [61] a trouvé une LC_{50} de 20.570 ppm pour 30 min. d'exposition. Pour des rats exposés pendant 240 min., Smyth [49] constate un taux de mortalité de 0 % pour 8000 ppm et de 100 % pour 16000 ppm. Salem [51] a exposé des souris à 2867 ppm pendant 274 minutes et enregistre un taux de mortalité de 100 %.

En résumé, le tableau 16 montre que les rares résultats connus ne coïncident pas de façon satisfaisante. Remarquons enfin que certaines expériences sont très anciennes.

Tableau 16. Toxicologie de l'acétaldéhyde

auteurs	animaux	nombres	durées d'exp. (min.)	conc. (ppm)	mortalité, remarques
<u>Ywanoff</u> 1911 [60]	chat	1	255	255	issue non fatale, salivation, larmes
	chats	4	180-300	995 à 4100	pas de mortalité, salivation, agitation, dyspnée, effet narcotique.
	chat	1	15	12500	issue fatale, mêmes symptômes qu'avant mais plus prononcés.
<u>Skog</u> 1950 [61]	rats	88	30	7780 à 31690	46 rats meurent. LC_{50} pour 30 min. d'exposition: 20570 ppm. Excitation pendant 10 à 15 min. puis anesthésie. Les survivants se réveillent 60 min. après la fin de l'exposition. <u>Histologie des poumons</u> : hyperhémies, hémorragies, oedèmes périvasculaires et intraalvéolaires. <u>Histologie du coeur et du foie</u> : oedèmes périvasculaires localisés. <u>Symptômes</u> : effets sur le système nerveux central.
<u>Guillerm</u> 1961 [58]	chiens (in vivo)		12	2780	pas de mortalité, arrêt du mouvement ciliaire
<u>Cook</u> 1945 [62]	chats		420	280	pas de mortalité, pas de troubles
<u>Smyth</u> 1937-1955 [49]	rats	50	240	8000	survivent tous
	rats	20	240	16000	meurent tous
<u>Salem</u> 1958 [51]	souris	50	274	2867	Les animaux des trois espèces tombent dans un état léthargique après 20 min. d'exposition, et meurent tous avant la fin de l'exposition. Poumons hémorragiques et volumineux. Emphysèmes, atélectasies, contractions des bronchioles, engorgements des vaisseaux sanguins.
	cobayes	20	452	3211	
	lapins	5	160	2856	

5.4. Méthode

5.4.1. Appareillage

Les souris sont placées dans une chambre d'expérimentation en plexiglas. Afin d'exposer nos animaux à différentes concentrations d'acétaldéhyde, nous avons construit un appareillage permettant de doser la quantité d'acétaldéhyde désirée, et de la mélanger à l'air affluant dans la chambre d'expérimentation. Le principe de l'appareillage est présenté dans la figure 6 : Une seringue de 20 ml, placée dans un frigidaire (5 °C) est remplie d'acétaldéhyde liquide (point d'ébullition 21 °C). Un injecteur à impulsions pousse périodiquement 6,6 microlitres d'acétaldéhyde liquide dans un tube placé à l'extérieur du frigidaire et chauffé par un bain-marie de 38 °C. Le liquide vaporisé rejoint un flux d'air de 10 litres par minute. Le mélange gazeux pénètre dans la chambre d'expérimentation avec la concentration désirée. Pour modifier celle-ci, on change la fréquence des impulsions de l'injecteur.

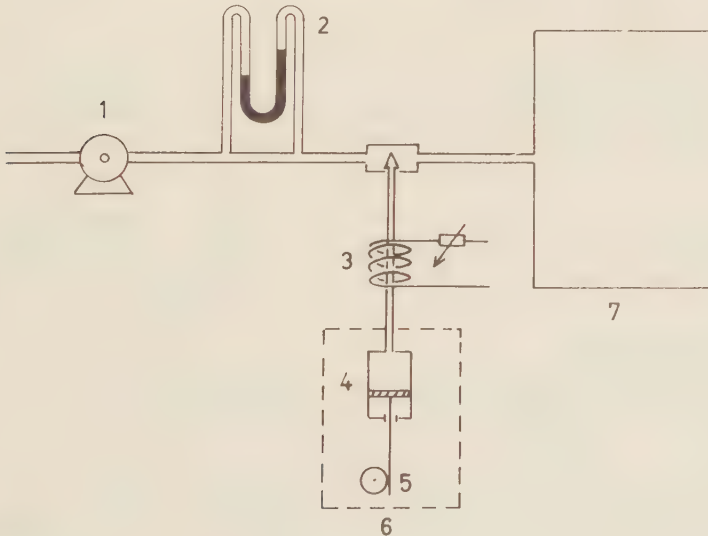


Fig.6 Appareillage

- | | |
|-----------------------|---------------------------------|
| 1 : pompe avec moteur | 4 : seringue à acétaldéhyde |
| 2 : manomètre | 5 : moteur actionnant le piston |
| 3 : chauffage | 6 : frigidaire |
| | 7 : chambre d'expérimentation |

5.4.2. Détermination chimique

On emploie la méthode de Nogare et al [59] pour déterminer de faibles concentrations d'acétaldéhyde en solution. Nous avons modifié cette méthode pour mesurer des concentrations plus élevées.

Le mélange gazeux d'air et d'acétaldéhyde est absorbé dans trois impingers en série, contenant 100 ml d'eau distillée. Les groupes carbonyl en présence d'hypoiodite forment du iodoforme par spectrophotométrie (347 m μ).

Des expériences préliminaires ont montré que l'acétaldéhyde était totalement absorbée dans les trois impingers.

Dans le tableau 17, nous avons reporté les concentrations réelles obtenues lors des différentes expériences. Nous avons calculé la limite de confiance à 95 %, c'est-à-dire les valeurs limites entre lesquelles se trouvent nos valeurs moyennes avec une probabilité de 95%.

Tableau 17. Concentrations d'acétaldéhyde dans la chambre d'expérimentation

concentrations théoriques (ppm)	nombres de mesures	moyennes des conc. (ppm)	déviations (s)	limites de confiance à 95 %
2500	16	2193	355,6	1482 - 2904
5000	21	4731	835,5	3060 - 6402
10000	16	9956	1116,3	7723 - 12189

5.4.3. Groupes d'animaux

Les animaux choisis pour les diverses expériences sont subdivisés en deux groupes:

Groupe 1

88 souris choisies pour les expériences de toxicité chronique (test de natation, mortalité chronique, poids corporel, analyse histologique), sont réparties au hasard en quatre sous-groupes:

- A : 19 souris entraînées à la natation exposées
- B : 19 souris entraînées à la natation contrôle
- C : 26 souris non entraînées à la natation exposées
- D : 24 souris non entraînées à la natation contrôle

Groupe 2

Pour l'étude de la mortalité aiguë, nous avons réparti un groupe de 175 souris en 5 sous-groupes.

5.4.4. Test de natation

Nous avons soumis au test de natation les animaux des sous-groupes A et B du groupe 1. Pour le déroulement du test, voir 3.3.1.

5.4.5. Mortalité chronique

45 souris des sous-groupes A et C du groupe 1 sont exposées aux concentrations théoriques croissantes de 2500, 5000, et 10.000 ppm. Les souris sont exposées à ces concentrations 2 fois 5 jours, 6 heures par jour, sauf pour la concentration de 10.000 ppm, qui a été administrée 5 heures par jour, 1 fois 5 jours et 1 fois 3 jours. Les 43 souris des sous-groupes B et D du groupe 1 sont placées dans les mêmes conditions d'expérience, inhalent de l'air frais, et servent de contrôle.

5.4.6. Mortalité aiguë

Les 5 sous-groupes de souris du groupe 2 sont exposés chacun 6 heures aux concentrations de 2200, 3500, 5300, 6250, et 10500 ppm.

5.4.7. Poids corporel

Dans le cadre des expositions chroniques, nous avons pesé une fois par semaine, chaque fois le quatrième jour, les souris du groupe 1 selon le schéma suivant:

A: animaux exposés entraînés	: pesés individuellement
B: animaux contrôle entraînés	: pesés individuellement
C: animaux exposés non entraînés	: pesés en groupe
D: animaux contrôle non entraînés	: pesés en groupe

5.4.8. Comportement

Nous avons enregistré, chez les souris du sous-groupe A exposées à 5000 ppm, des sauts et des tentatives de fuite lors du test de natation.

5.4.9. Analyse histologique

Dans le cadre des expériences de toxicité chronique, 10 souris survivantes des sous-groupes A et C du groupe 1 ont été sacrifiées 24 heures après la fin de la dernière exposition. Leurs poumons et leur trachée ont été prélevés pour être soumis à une analyse histologique. Nous avons procédé aux mêmes examens pour les organes correspondants de 15 souris contrôle des sous-groupes B et D du groupe 1.

5.5. Résultats

5.5.1. Test de natation

Les test de natation se sont déroulés deux fois par semaine pendant les deux expositions successives de deux fois cinq jours chacune aux concentrations croissantes de 2500 ppm et de 5000 ppm.

Les moyennes des temps de natation (quatre séances par concentration étudiée) sont reportées dans la figure 7. Lors de l'exposition à 2500 ppm, nous n'avons constaté aucune différence entre les temps de natation des souris exposées et ceux des souris contrôle. Lors de l'exposition à 5000 ppm, nous constatons chez les souris exposées une légère prolongation de 0,96/100 min. pour les temps de natation avec charge, et de 0,69/100 min. pour les temps de natation sans charge. Ces résultats furent soumis au test de Student. L'analyse statistique montre que la différence entre les temps de natation sans charge des animaux exposés et contrôle est fortement significative ($p < 0,005$), tandis que celle des animaux exposés et contrôle soumis à une charge n'est pas significative ($p > 0,05$). Ces mêmes souris exposées ensuite à 10.000 ppm furent incapables de nager. En effet, au début de l'exposition, elles présentaient une forte excitation, et après 15 à 30 minutes, elles tombèrent dans une profonde torpeur (léthargie) qui ne disparut que deux à trois heures après le fin de l'exposition.

Les souris contrôle ont également nagé deux fois par semaine pendant quatre semaines. A la fin de l'expérience, ces animaux avaient amélioré leur temps de natation de 0,26/100 min. pour les courses avec charge, et de 0,18/100 min. pour les courses sans charge.

Nous avons soumis l'ensemble des résultats des temps de natation à l'analyse de variance. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 18. On constate que toutes les sources de variation sont significatives, à l'exception des différences dues au changement de concentration.

Sur la base de l'analyse de variance, nous avons calculé selon Duncan la signification des temps de natation pour les différents jours de test (tableau 19), et pour les cinq courses (tableau 20). Comme l'indique le tableau 19, nous voyons qu'à une exception près, tous les temps de natation des quatre jours de test lors de l'exposition à 5000 ppm sont statistiquement significatifs par rapport aux temps de natation des animaux contrôle.

Le tableau 20 montre que lors de l'exposition à 2500 ppm, les temps de natation de 3 courses sur 5 avec charge sont significativement supérieurs aux temps correspondants des animaux contrôle. Lors de l'exposition à 5000 ppm, les animaux exposés ont, pour les 5 courses avec et sans charge, des temps de natation significativement supérieurs aux temps de natation des animaux contrôle.

Nous avons déterminé les coefficients de corrélation R des rangs selon Spearman : $R = 0,710$ pour les animaux contrôle, $R = 0,343$ pour les animaux exposés. Dans le premier cas, le coefficient de corrélation est significatif ($p < 0,05$), dans le second cas, il n'est pas significatif ($p > 0,05$).

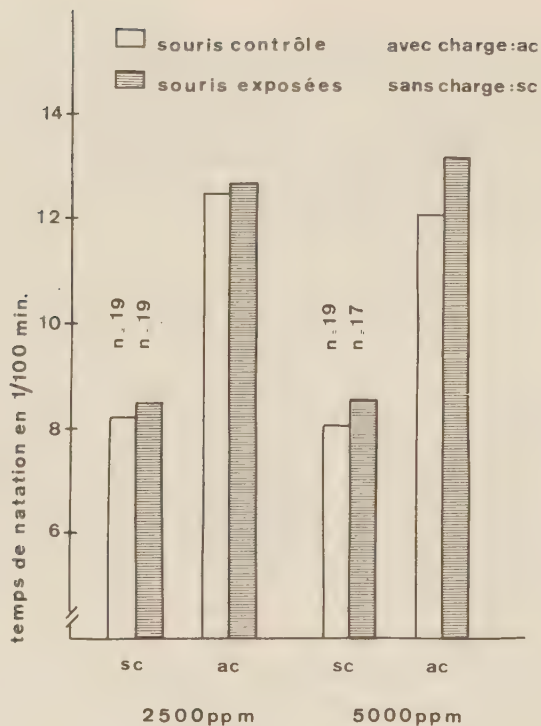


Fig.7 Moyennes des temps de natation

Chaque colonne représente la moyenne des quatre essais réalisés pendant deux semaines d'exposition.

Tableau 18 . Analyse de variance

L'analyse de variance englobe tous les résultats des temps de natation pour les deux concentrations d'acétaldéhyde.

sources de variation	degrés de liberté	produits des carrés	valeurs de F	p
courses (c)	4	68,2	1905,44	≤ 0,01
jours (j)	3	0,168	4,69	< 0,01
poids (p)	1	741,010	20670,64	< 0,01
concentrations (n)	1	0,077	2,17	> 0,05
groupes (g)	1	10,58	29,55	< 0,01

Tableau 19 . Moyennes des temps de natation pour chaque jour de test
lors des expositions à 2500 et 5000 ppm d'acétaldéhyde.

conc. (ppm)	jours de test	temps de natation (indiqués en 1/100 min.) des animaux:			
		exposés sans charge	contrôle sans charge	exposés avec charge	contrôle avec charge
2500	2	8,28	8,25	12,78	12,73
	5	8,39	8,19	12,98	12,93
	9	8,74 *	8,31	12,73	12,61
	12	8,39 *	8,09	12,38 **	11,70
5000	2	8,85 **	7,85	13,74 **	12,21
	5	8,80 **	8,11	12,53 **	11,94
	9	8,29 **	7,77	13,08 **	12,08
	12	8,62	8,40	13,41 **	12,68

* : $p < 0,05$

** : $p < 0,01$

Tableau 20 . Moyennes des temps de natation des 5 courses avec et sans
charge lors des expositions à 2500 et 5000 ppm d'acétaldéhyde

conc. (ppm)	courses	temps de natation (indiqués en 1/100 min.) des animaux:			
		exposés sans charge	contrôle sans charge	exposés avec charge	contrôle avec charge
2500	1	7,30	7,14	10,51 **	9,97
	2	7,91	7,74	11,45 **	10,87
	3	8,43	8,25	12,27	12,51
	4	9,18 **	8,69	13,95 **	13,46
	5	9,53	9,24	15,45	15,68
5000	1	7,23 *	6,82	10,63 **	9,91
	2	8,18 **	7,61	11,94 **	11,31
	3	8,82 **	8,14	13,07 **	12,17
	4	9,32 **	8,48	14,28 **	13,31
	5	9,65 *	9,28	16,05 **	14,63

* : $p < 0,05$

** : $p < 0,01$

5.5.2. Mortalité lors de l'exposition chronique

Nous avons enregistré la mortalité survenant chez les animaux soumis au test de natation et exposés aux concentrations croissantes de 2500, 5000, et 10.000 ppm.

Les sous-groupes A et C du groupe 1 comprennent 19 souris entraînées et 26 souris non entraînées à la natation (total: 45 animaux exposés). Chez les souris contrôle, nous avons dans les sous-groupes B et D du groupe 1 : 19 souris entraînées et 24 non entraînées (total: 43 animaux contrôle). Les résultats sont rapportés dans le tableau 21.

Aucune souris n'est morte à 2500 ppm, 11 % des animaux meurent à 5000 ppm, et 90 % meurent lors de l'exposition à 10.000 ppm.

Les résultats de mortalité obtenus lors de l'exposition chronique permettent de situer la LC_{50} chronique à environ 7000 ppm.

Tableau 21 . Mortalité au cours de l'expérience de toxicité chronique de l'acétaldéhyde

animaux	nombres	durées de l'exposition	conc.théoriques (ppm)	conc.mesurées (ppm)	taux de mortalité en %
exposés	45	6 heures/jour 2 fois 5 jours	2500	2130	0
contrôle	43		--	--	0
exposés	45	6 heures/jour 2 fois 5 jours	5000	4060	11
contrôle	43		--	--	0
exposés	40	5 heures/jour 1 fois 5 jours 1 fois 3 jours	10000	8800	90
contrôle	43		--	--	0

$LC_{50} \approx 7000 \text{ ppm}.$

5.5.3. Mortalité lors de l'exposition de toxicité aiguë

175 souris du groupe 2 sont exposées pendant six heures à l'une des concentrations suivantes : 2200, 3500, 5300, 6250, 10.500 ppm.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 22. La mortalité est négligeable aux concentrations inférieures à 5300 ppm. Elle monte à 36 % à 6250 ppm, et 74 % lors de l'exposition à 10.500 ppm.

Sur la base de ces résultats, nous avons calculé selon Behrens une LC_{50} aiguë égale à 8000 ppm pour une exposition de six heures.

Tableau 22 . Mortalité au cours de l'expérience de toxicité aiguë de l'acétaldéhyde. (une seule exposition de 6 heures)

nombres des animaux exposés	conc.moyennes mesurées (ppm)	nombres d'animaux morts	taux de mortalité en %
30	2200	0	0
10	3500	0	0
55	5300	2	4
30	6250	11	36
50	10500	37	74

LC_{50} = 8000 ppm (calculée selon Behrens)

5.5.4. Poids corporel

Tous les animaux ont été pesés lors de l'exposition chronique. Les résultats sont représentés graphiquement à la figure 8. Voir aussi le tableau 23.

Nous constatons que l'exposition aux concentrations de 2500 et de 5000 ppm d'acétaldéhyde n'entraîne pas de diminution marquée du poids chez les souris exposées entraînées à la natation (sous-groupe A). Lors de l'exposition à 10.000 ppm, le poids des souris du sous-groupe A baisse fortement. Les souris contrôle et entraînées à la natation (sous-groupe B) subissent une lente augmentation de poids corporel. Après 4 semaines d'exposition, la différence moyenne entre les poids moyens des souris des sous-groupes A et B est de 1,1 g. Pendant la première et la deuxième semaine d'exposition à 10.000 ppm (c'est-à-dire la cinquième et la sixième semaine de l'expérience), cette différence moyenne atteint 8,5 g resp. 7,6 g. Les diminutions de poids mises ainsi en évidence sont statistiquement assurées par le test de Wilcoxon pour chacune de ces deux semaines.

Dans la figure 8, nous avons aussi reporté le poids moyen des animaux exposés non entraînés à la natation (sous-groupe C) et le poids moyen des animaux contrôle non entraînés (sous-groupe D). Les animaux des sous-groupes C et D furent pesés également le quatrième jour de chaque semaine, mais pas individuellement. Là aussi, nous constatons que le poids des souris exposées décroît fortement pendant les deux semaines d'exposition à 10.000 ppm.

Nous remarquons que la moyenne des poids des souris exposées non entraînées à la natation (sous-groupe C) reste inférieure au poids moyen des animaux exposés entraînés à la natation (sous-groupe A) pendant toute la durée de l'expérience.

Le poids moyen des animaux entraînés contrôle (sous-groupe B) est pratiquement identique à celui des animaux non entraînés contrôle (sous-groupe D).

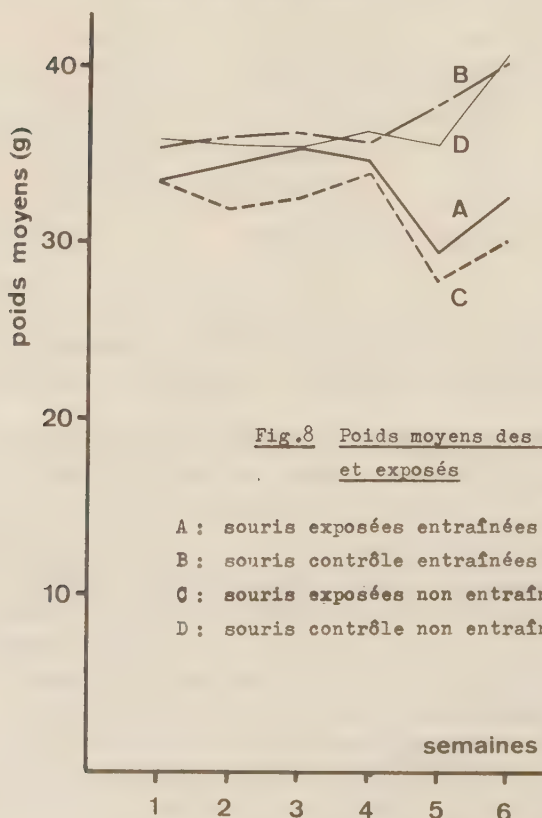


Fig.8 Poids moyens des animaux contrôle et exposés

- A : souris exposées entraînées à la natation
- B : souris contrôle entraînées à la natation
- C : souris exposées non entraînées à la natation
- D : souris contrôle non entraînées à la natation

Tableau 23 . Poids moyens des souris exposées et des souris
contrôle entraînées à la natation (sous-groupes A et B).

animaux	sous- groupes	nombres	semaines	conc. (ppm)	poids g	test de Wilcoxon p
exposés	A	19	1	--	33,6	> 0,05
contrôle	B	19	1	--	33,3	
exposés	A	19	2	2500	34,4	> 0,05
contrôle	B	19	2	--	35,9	
exposés	A	18	3	5000	35,4	> 0,05
contrôle	B	19	3	--	36,2	
exposés	A	17	4	5000	34,7	> 0,05
contrôle	B	19	4	--	35,7	
exposés	A	10	5	10000	29,4	< 0,01
contrôle	B	19	5	--	37,9	
exposés	A	7	6	10000	32,8	< 0,01
contrôle	B	19	6	--	40,4	

5.5.5. Comportement

Lors de l'exposition à 10.000 ppm, les souris du sous-groupe A étaient plongées dans une profonde torpeur, et de ce fait, ne pouvaient être soumises au test de natation. Par contre, lors des expositions à 2500 et à 5000 ppm, ces mêmes souris présentaient un état d'excitation marqué pendant les séances de natation. Lors de l'exposition à 5000 ppm nous avons enregistré les sauts et les tentatives de fuite hors du canal de natation. Ces observations sont rapportées dans le tableau 24. Nous voyons que dans un groupe de 17 souris, un certain nombre d'animaux (de 8 à 11) effectuait des sauts.

Tableau 24 . Comportement des souris exposées à 5000 ppm d'acétaldéhyde :
observations faites pendant les tests de natation .

tests	animaux	nombres d'animaux	nombres d' animaux excités	nombres de sauts enregistrés
1	exposés	17	11	31
	contrôle	19	0	0
2	exposés	17	9	26
	contrôle	19	0	0
3	exposés	17	10	31
	contrôle	19	0	0
4	exposés	17	8	18
	contrôle	19	0	0

5.5.6. Analyse histologique

10 souris sur 45 (sous-groupes A et C) ont survécu aux expositions successives à 2500 , 5000 , et 10.000 ppm. 24 heures après la fin de la dernière exposition , elles furent sacrifiées . Les poumons et les trachées furent prélevés et soumis à des analyses histologiques . Les résultats sont résumés dans le tableau 25 . Il en ressort que l'exposition à l'acétaldéhyde a provoqué chez ces souris des signes d'irritation et d'inflammation . Les modifications pathologiques sont particulièrement marquées dans la trachée où l'on observe des lésions épithéliales accompagnées d'exsudats récents de fibrine , et d'infiltrations cellulaires , signes d'inflammations plus anciennes . Les métaplasies de l'épithélium pavimenteux révèlent des processus d'irritation chronique .

15 souris contrôle (sous-groupes B et D) ont été soumises aux mêmes analyses histologiques . Leurs organes ne présentaient évidemment aucune modification pathologique .

Tableau 25. Observations histologiques faites sur les poumons et les trachées de 10 souris exposées à l'acétaldéhyde

organes	observations histologiques	nombres de souris atteintes
poumons	inflammations cellulaires	8
poumons	atélectasies	4
poumons	hyperplasies des cellules alvéolaires	2
poumons	métaplasies de l'épithélium pavimenteux	1
trachées	exsudats de fibrine	4
trachées	métaplasies de l'épithélium pavimenteux	4
trachées	signes inflammatoires	8

5.6. Discussion

5.6.1. Test de natation

L'exposition à 2500 ppm n'a provoqué chez les souris exposées, qu'un très faible ralentissement des temps de natation par rapport à ceux des souris contrôle.

Lors de l'exposition à 5000 ppm, les différences entre les temps des animaux exposés et contrôle sont plus marquées. Le test de Student ne donne des différences significatives que pour les temps de natation sans charge, le test de Duncan pour les temps de natation avec et sans charge.

Les animaux exposés à 10.000 ppm n'ont pas pu nager. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu faire d'expériences à des concentrations intermédiaires.

L'excitation provoquée par l'exposition à l'acétaldéhyde est caractéristique de cette substance (voir 5.5.5.) : Nous n'avons pas observé de semblables phénomènes lors d'expériences avec d'autres gaz irritants. Nous pouvons nous demander si cette excitation n'a pas influencé les résultats du test de natation. Par exemple, lors de l'exposition à 2500 ppm, les animaux exposés ont des temps de natation plus courts que les animaux contrôle (troisième et cinquième course).

Lors de l'exposition à 5000 ppm, les temps de natation des animaux exposés par rapport à ceux des animaux contrôle sont significativement plus lents (test de Duncan). Un deuxième test (t-test) assure une différence significative entre animaux exposés et animaux contrôle pour les courses sans charge et non pour les courses avec charge. Il n'est pas exclu que la nervosité provoquée par l'acétaldéhyde soit responsable de ces différences de comportement.

Le fait que l'ordre des rangs des animaux entre les expositions à 2500 ppm et à 5000 ppm se modifie, pourrait également être une conséquence de la nervosité observée lors de l'exposition à 5000 ppm. L'ensemble des résultats des tests de natation montre que l'acétaldéhyde provoque une prolongation des temps de natation.

Les résultats de l'analyse histologique nous incitent à supposer que le lieu d'impact de l'acétaldéhyde se situe au niveau des organes respiratoires qui ont souffert d'inflammations, d'atélectasies, et d'hyperplasies alvéolaires.

5.6.2. Mortalité chronique

Sur la base de nos expériences, nous pouvons évaluer une LC_{50} chronique d'environ 7000 ppm. Cette valeur est valable pour une exposition allant jusqu'à 6 semaines (5 fois 6 heures par semaine). Nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'études de toxicité chronique.

5.6.3. Mortalité aiguë

Les résultats à toxicité aiguë ne sont pas très différents de ceux à toxicité chronique. La mortalité, pratiquement nulle pour les concentrations inférieures à 5300 ppm, croît rapidement lorsque les concentrations augmentent. La LC_{50} aiguë vaut environ 8000 ppm. Nous voyons que la LC_{50} chronique est du même ordre de grandeur que la LC_{50} aiguë. Ce résultat montre qu'à l'inverse du NO_2 , l'acétaldéhyde ne produit pas de tolérance. De plus, il nous paraît étonnant que la différence entre la LC_{50} chronique (définie, rappelons-le, sur une période de six semaines d'expositions successives), et la LC_{50} aiguë, n'est pas plus marquée. Ceci nous amène à supposer que les mécanismes provoquant la mort sont les mêmes pour l'expérience aiguë et pour l'expérience chronique.

La valeur de notre LC_{50} aiguë est plus élevée que celle trouvée par Salem [51]. Cet auteur enregistre une mortalité de 100 % chez des souris exposées pendant quatre heures et demie à 2867 ppm d'acétaldéhyde. Dans le tableau 22, nous avons rapporté les taux de mortalité suivants pour une exposition de 6 heures : pas de mortalité à 3500 ppm, 4 % à 5300 ppm, 36 % à 6250 ppm, et 74 % à 10.500 ppm. La différence entre les résultats de Salem [51] et les nôtres est marquée. Cependant, les expériences de Smyth [49] et de Skog [61] parlent en faveur de nos résultats. Bien que ces auteurs aient observé chez des rats une toxicité moins prononcée, leurs résultats se rapprochent davantage des nôtres que de ceux de Salem [51].

5.6.4. Poids corporel

On ne constate pas de différence entre le poids corporel des animaux exposés et celui des animaux contrôle, sauf lors de l'exposition à 10.000 ppm. Pour cette dernière exposition, les effets dus à l'acétaldéhyde sont bien marqués.

Lors des expositions au NO_2 , nous avons constaté que les animaux entraînés avaient un poids corporel plus élevé que les animaux non entraînés. Ce même phénomène se répète dans les expériences avec l'acétaldéhyde, bien que les différences soient moins prononcées. Notons encore à ce sujet que dans ces essais, nous n'avons pas observé de morsures infectieuses chez les souris.

Dans cette expérience, il y a plusieurs facteurs d'incertitude, si bien qu'il nous est impossible d'interpréter l'augmentation de poids des souris entraînées.

On enregistre les premiers effets de l'acétaldéhyde à 5000 ppm sur la mortalité chronique, sur la mortalité aiguë, et sur le test de natation mais une influence significative sur le poids corporel n'a été décelée que pour l'exposition à 10.000 ppm. Nous pouvons en conclure que le poids corporel est un critère peu sensible pour juger des effets chroniques de l'acétaldéhyde.

5.6.5. Comportement

Le comportement particulier observé chez des animaux exposés aux concentrations de 2500 ppm et de 5000 ppm se traduit par une excitation motrice considérable. Après 10 minutes d'exposition à 10.000 ppm, toute excitation a disparu, et les animaux tombent dans une profonde torpeur qui ne peut être expliquée clairement.

Collins et Cohen [79, 80] ont démontré in vivo et in vitro que l'acétaldéhyde résultant du catabolisme de l'alcool, forme avec l'adrénaline une liaison isoquinoline, qui possède des propriétés très semblables à celles d'alcaloïdes pharmacologiquement actifs du type isoquinoline, comme par exemple la papavérine et la mescaline. Ces observations permettent de supposer que l'acétaldéhyde a, en effet, une action stimulante sur le système nerveux central, et que cette action peut être due à une interaction avec l'adrénaline. On peut se poser une autre question : Est-ce que l'effet stimulant de la fumée de cigarette serait dû non seulement à la nicotine, mais partiellement à l'acétaldéhyde ? Cette question reste ouverte.

6. Acroléine

6.1. Propriétés physico-chimiques

L'acroléine, qu'on appelle aussi aldéhyde acrylique ou propénal, est un liquide limpide, légèrement jaunâtre, d'odeur désagréable, âcre et pénétrante, qui provoque des irritations nasales et oculaires.

formule chimique	$\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CHO}$
poids moléculaire	56,1
point de fusion	-87 °C
point d'ébullition (à 760 mm Hg)	52,7 °C
pression de vapeur (à 20 °C)	214 mm Hg
densité de vapeur (air = 1)	1,94
température d'auto-ignition	234 °C
facteurs de conversion	1 ppm (vapeur) = 2,3 mg/m ³ 1 mg/l (vapeur) = 436 ppm.

L'acroléine est peu soluble dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques habituels. Le liquide est très inflammable. Les vapeurs d'acroléine sont presque deux fois plus lourdes que l'air.

Une caractéristique essentielle de l'acroléine est la réaction de polymérisation qui se manifeste spontanément à l'air. Son polymère, le disacryl, est une masse plastique insoluble dans l'eau.

L'acroléine fut découverte il y a plus d'un siècle dans des vapeurs provenant de la distillation des matières grasses, plus précisément lors de la déshydrogénation à haute température du glycérol. Cette substance apparaît encore dans les opérations industrielles suivantes: fonderies, imprimeries, fabrication de linoléum. On la trouve également en très faibles quantités dans les gaz d'échappement des véhicules automobiles.

On peut classer les possibilités d'utilisation de l'acroléine en trois groupes:

- a) Utilisation en organosynthèse: plastifiants, résines, textiles artificiels, substances chimiques.
- b) Utilisation agricole: herbicide
- c) Utilisation sanitaire: désinfection des canaux d'irrigation, élimination des mollusques vecteurs de bilharziose.

Il est encore plus important de signaler la présence d'acroléine dans certains vins, dans l'huile de friture, et dans la fumée de tabac.

Wynder et al [1] ont trouvé 70 mg d'acroléine dans la fumée d'une cigarette sans filtre. Les quantités obtenues par d'autres auteurs varient entre 45 mg et 83 mg.

Dans la fumée de cigarette, les concentrations d'acroléine atteignent 150 ppm [3]. Les concentrations mesurées dans l'air atmosphérique des villes varient entre 0,01 ppm et 0,015 ppm [65]. Le seuil de perception olfactive se situe, selon Plotnikova [69] à 0,35 ppm. La limite tolérable (threshold limit value) pour les vapeurs d'acroléine a été fixée par le comité des hygiénistes américains [70] à 0,1 ppm.

6.2. Effets pathogènes chez l'homme

En contact avec la peau ou avec les muqueuses, l'acroléine provoque rapidement un syndrome d'irritation avec erythème et oedème. Ces atteintes peuvent être comparées à des brûlures ordinaires. Il va de soi que de pareils accidents peuvent être particulièrement dangereux au niveau de la cornée.

L'inhalation accidentelle de vapeurs d'acroléine représente dans l'industrie le risque le plus important. Selon Koelsch [66] et Patty [39], les vapeurs d'acroléine produisent une forte dyspnée en plus de l'irritation douloureuse des voies respiratoires.

Patty [39] rapporte qu'une concentration de 150 ppm peut être mortelle chez l'homme. Plus récemment, Champeix et Catilina [67] ont décrit un accident dû à l'inhalation de vapeurs d'acroléine : 20 heures après une exposition accidentelle, un ouvrier aurait présenté une dyspnée très marquée avec suffocation, de la cyanose, une sensation de striction thoracique, une expectoration mousseuse et légèrement rosée. L'examen du thorax aurait montré les signes caractéristiques d'un oedème pulmonaire.

Les effets d'une exposition chronique à l'acroléine ne sont guère connus chez l'homme. Derobert [68] a observé des céphalées et des troubles respiratoires chez des ouvriers exposés de façon répétée à de très faibles concentrations d'acroléine

6.3. Toxicologie

Skog [61] a étudié les effets d'inhalation de vapeurs d'acroléine sur les rats. Il a observé une hyperactivité des animaux au début de l'exposition, suivie de manifestations de sédation.

L'hyperactivité serait due à l'irritation du tractus respiratoire . Elle a été observée et confirmée par d'autres auteurs. L'étude histologique des rats exposés par Skog a révélé des oedèmes , des hémorragies , une hyperémie , et des anomalies probablement de nature dégénérative de l'épithélium bronchique. Le coeur , le foie , et les reins présentaient également une hyperémie.

Salem [51] a analysé les poumons de souris , de cobayes , et de lapins exposés préalablement à environ 2000 ppm d'acroléine. Les poumons étaient oedémateux et hémorragiques avec des exsudats dans la cavité pleurale. Les alvéoles étaient distendues et les septa alvéolaires épaissis ou parfois rompus.

Selon Guillerm [58] l'acroléine serait un puissant inhibiteur de l'activité ciliaire de l'épithélium respiratoire . Une concentration de 60 ppm arrêterait le mouvement ciliaire après 11 minutes . L'auteur en déduit que les deux aldéhydes acroléine et acétaldéhyde agissent en synergisme .

Murphy [71] a étudié chez les cobayes les effets d'une inhalation d'acroléine sur les fonctions respiratoires. L'auteur rapporte qu'après une inhalation de 1 ppm pendant deux heures , il y a une augmentation de la résistance et de l'amplitude respiratoire au repos , alors que la fréquence respiratoire diminue.

Le même auteur [16 , 72] a étudié les effets de l'acroléine sur les enzymes du foie chez les rats . Une inhalation de 2,1 ppm pendant 40 heures augmente le taux de phosphatase alcaline du foie de 46 % . L'auteur interprète ce résultat comme étant une réponse de l'organisme à un stress . En outre , il a observé une élévation du taux de transaminase de la tyrosine . L'auteur suppose que l'action irritante de l'acroléine provoque , par l'intermédiaire du système pituitaire-adréналien , une hypersécrétion des glucocorticoïdes. Ces dernières stimulent à leur tour la production de protéines enzymatiques du foie .

Champeix et Catilina [67] ont exposé des rats pendant 10 minutes à différentes concentrations allant de 65 ppm à 461 ppm . Les doses faibles altérèrent le revêtement ciliaire , les doses moyennes détruisirent le parenchyme pulmonaire , les doses fortes causèrent des dégâts épithéliaux plus importants . En plus , les auteurs ont observé des hémorragies punctiformes au niveau des reins , des surrénales , et de l'encéphale , ainsi que des foyers nécrotiques au niveau du foie .

A 436 ppm, tous les animaux meurent par asphyxie aiguë. Les voies trachéo-bronchiques sont lésées et rendent la ventilation impossible. A 327 ppm, les 50 % des animaux meurent. Les dégâts les plus importants se situent dans la partie supérieure seulement des voies trachéo-bronchiques. Les animaux meurent en partie par épuisement rapide dû à la lutte contre l'obstruction de la trachée et des grosses bronches, en partie plus tard à la suite d'une infection secondaire des voies aériennes.

A 283 ppm, on retrouve les mêmes atteintes, mais moins prononcées. L'épithélium des voies respiratoires présente des signes d'irritation. On trouve des séquelles encore longtemps après l'intoxication : foyers purulents et abcès enkystés.

La bibliographie concernant la toxicologie de l'acroléine chez les animaux est résumée dans le tableau 26.

Tableau 26 : Toxicologie de l'acroléine

auteurs	animaux	conc.(ppm)	durée de l'exposition	taux de mortalité en %	observations
Iwanoff [60]	chats	11		0	difficultés respiratoires
	chats	690-1157		100	dyspnée, oedèmes, hémorragies
Carpenter [74]	rats	8	4 heures	33 50 66	
Jacobs [75]	souris	152	10 min.	60	
	souris	3	quelques heures	0	
Skog [61]	rats	43-304	30 min.		dyspnée, oedèmes, hyperémies, modifications dégénératives. $LC_{50} = 133$ ppm
Smyth [49]	rats	8	4 heures	17	irritations des yeux et du tractus respiratoire supérieur
	rats	16	4 heures	100	mêmes observations
Guillerm [58]	rats	61	11 min.		bloquage du mouvement ciliaire
Salem [51]	souris	2038	17 min.	100	oedèmes, vaisseaux sanguins dilatés et engorgés, constriction bronchique, atélectasies.
	cobayes	2186	63 min.	100	
	lapins	2038	35 min.	100	
Murphy [71]	souris	0,9	6 heures		activité volontaire diminuée de 25 % .
	cobayes	1	2 heures		augmentation de l'amplitude respiratoire (205 %), augmentation de la résistance respiratoire (126 %), diminution de la fréquence respiratoire (67 %) .
Murphy [16]	rats	4,1	20 heures		dyspnée, anorexie, faiblesses, augmentation du taux de phosphatase alcaline du foie
	rats	2,1	41 heures		
	rats	1	81 heures		
Shell Chemical Corp. [78]	souris		1 min. 10 min.		$LC_{50} = 875$ ppm $LC_{50} = 175$ ppm
Murphy [72]	rats	8	4 heures	0	augmentation des taux de phosphatase alcaline et de transaminase, anorexie.
Champeix [67]	rats	261	10 min.		sécrétions nasales, cyanose, dyspnée
	rats	283	10 min.	12,5	
	rats	304	10 min.	35	
	rats	327	10 min.	50	
	rats	349	10 min.	65	dyspnée, encombrements bronchiques, cyanose,
	rats	391	10 min.	85	perte de poids (30 % en 6 à 8 jours)
	rats	436	10 min.	100	

6.4. Méthode

6.4.1. Appareillage

Nous avons placé les souris dans une chambre d'expérimentation en plexiglas déjà décrite (voir 3.2.). Afin d'exposer ces animaux à des concentrations d'acroléine différentes, nous avons construit un appareillage permettant de doser la quantité d'acroléine désirée et de la mélanger à l'air affluant dans la chambre d'expérimentation. Le principe de l'appareillage est représenté par la figure 9 : Une seringue de 10 ml est remplie d'acroléine liquide. Un moteur pousse périodiquement le piston de la seringue. Chaque impulsion introduit 3,33 microlitres d'acroléine dans le flux d'air. Ce mélange traverse un bain-marie chauffé à 60 °C, afin que l'acroléine se vaporise. A la sortie du bain-marie, le mélange rejoint un deuxième flux d'air qui s'écoule dans la chambre d'expérimentation. Le premier flux d'air a un débit de 2 litres par minute, et le second, un débit de 10 litres par minute. Pour modifier les concentrations, il suffit de changer la fréquence des impulsions de l'injecteur.

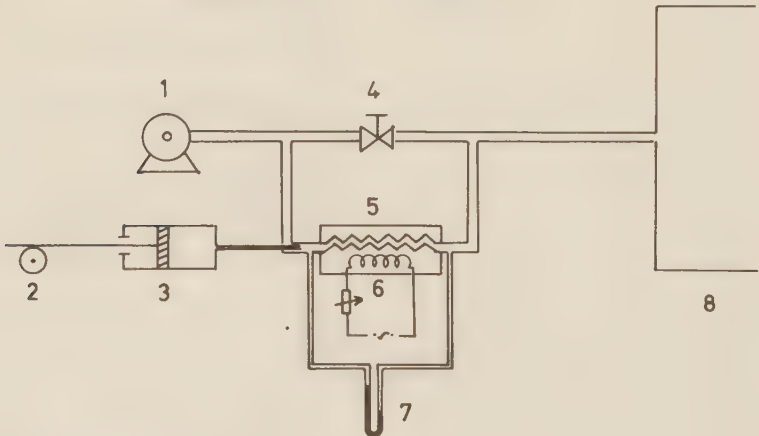


Fig.9 Appareillage

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| 1 : pompe avec moteur | 5 : bain-marie |
| 2 : moteur actionnant le piston | 6 : chauffage du bain-marie |
| 3 : seringue à acroléine | 7 : manomètre |
| 4 : by-pass réglable | 8 : chambre d'expérimentation |

La température à l'intérieur de la chambre d'expérimentation est égale à la température de l'air ambiant. Elle varie entre 22 °C et 25 °C.

6.4.2. Détermination chimique des différentes concentrations d'acroléine

La méthode chimique que nous avons choisie est celle de Cohen et Saltzman [73]. Elle permet de déterminer des concentrations dans l'air variant de 0,001 à 10 ppm.

Une quantité déterminée d'air, aspirée de la chambre d'expérimentation, passe à travers trois impingers disposés en série, contenant chacun une solution d'absorption (4-hexylresorcinol, acide trichloracétique, et chlorure de mercure). La réaction chimique de l'acroléine avec le 4-hexylresorcinol s'accompagne d'une coloration bleue dont la bande d'absorption est mesurée par spectrophotométrie.

Le tableau 27 montre la répartition de l'acroléine absorbée dans les impingers en série. Nous constatons que les 99 % de l'acroléine sont absorbés dans les trois impingers.

Tableau 27. Répartition de l'acroléine dans les impingers en série

concentrations théoriques (ppm)	nombres de mesures	pourcentages d'absorption des impingers			
		imp.No.1	imp.No.2	imp.No.3	totaux
6	6	75,62	19,57	3,94	99,13
15	3	76,44	20,73	2,69	99,86
25	5	63,09	28,42	7,68	99,19
50	6	51,13	32,80	16,00	99,93
100	4	59,71	29,61	10,62	99,94
200	5	55,40	30,53	14,01	99,94

Dans le tableau 28, nous donnons les concentrations considérées au cours de nos expériences, les concentrations mesurées correspondantes, et leurs limites de confiance ($\bar{x} \pm 2s$), c'est-à-dire les deux valeurs entre lesquelles se situent nos valeurs moyennes avec une probabilité de 95 %.

Tableau 28. Concentrations d'acroléine dans la chambre d'expérimentation

concentrations théoriques (ppm)	nombres de mesures	moyennes des conc. mesurées ($\bar{x}$) (ppm)	s	limites de con- fiance ($\bar{x} \pm 2s$)
6	17	6,02	1,02	3,98 - 8,06
15	6	14,73	2,30	10,1 - 19,33
25	11	24,76	5,34	14,08 - 35,44
50	9	51,35	3,45	44,45 - 58,25
100	9	100,10	17,40	65,30 - 134,90
200	7	174,65	15,17	144,31 - 204,99

6.4.3. Groupes d'animaux

Les expériences ont été effectuées sur 3 groupes de souris :

Groupe I : Les 90 souris choisies pour les expériences chroniques sont réparties au hasard en 4 sous-groupes :

sous-groupe A :

19 souris entraînées à la natation : souris exposées

sous-groupe B :

17 souris entraînées à la natation : souris contrôle

sous-groupe C :

28 souris non entraînées : souris exposées

sous-groupe D :

26 souris non entraînées : souris contrôle

Groupe II : Nous avons choisi 34 souris albinos mâles de même provenance pour une exposition chronique complémentaire .

Groupe III : Pour l'étude de la toxicité aiguë de l'acroléine , nous avons réparti 108 souris en 4 sous-groupes .

6.4.4. Test de natation

Pour notre test de natation (sous-groupes A et B du groupe I) , nous avons employé la méthode de Bättig [10] , qui mesure les temps de natation des souris dans un canal .

6.4.5. Mortalité chronique

47 souris mâles (groupe I , sous-groupes A et C) pesant entre 25 et 30 g sont exposées aux concentrations théoriques croissantes de 6 , 15 , 25 , et 50 ppm . Les souris sont exposées à ces concentrations 2 fois 5 jours , 6 heures par jour , sauf pour la concentration de 50 ppm qui n'a été administrée qu'un seul jour pendant 6 heures . Au cours d'une expérience complémentaire , un groupe de 34 souris (groupe II) fut exposé à 50 ppm , 6 heures par jour , pendant 5 jours consécutifs .

6.4.6. Mortalité aiguë

Les 108 souris du groupe III pesant entre 30 et 35 g , sont réparties en 4 sous-groupes exposés chacun 6 heures aux concentrations de 31 , 61 , 80 , 119 ppm .

6.4.7. Poids corporel

Dans le cadre des expositions chroniques, nous avons pesé les souris du groupe I selon le schéma suivant :

A : animaux exposés entraînés	pesés individuellement
B : animaux contrôle entraînés	pesés individuellement
C : animaux exposés non entraînés	pesés en groupe
D : animaux contrôle non entraînés	pesés en groupe

6.4.8. Analyses histologiques

Dans le cadre des expériences de toxicité chronique, 15 souris appartenant aux sous-groupes A et C exposées successivement à 6, 15, 25, et 50 ppm d'acroléine, ont été sacrifiées 24 heures après la fin de la dernière exposition. Leurs poumons et leur trachée ont été prélevés et soumis à des analyses histologiques, de même que les organes correspondants de 10 souris contrôle appartenant aux sous-groupes B et D.

6.5. Résultats

6.5.1. Test de natation

Les tests de natation se sont déroulés 2 fois par semaine pendant les trois expositions de 15 jours chacune aux concentrations croissantes de 6, 15, 25 ppm d'acroléine.

Les moyennes des temps de natation sont représentées graphiquement à la figure 10. On constate que les souris exposées à l'acroléine ont une tendance à nager plus lentement. Les différences entre les moyennes des temps de natation des souris exposées et celles des souris contrôle ne sont statistiquement significatives pour aucun des deux tests (avec et sans charge). Pendant la période d'exposition à 25 ppm, le test de Student donne $t = 2,020$ ($p \approx 0,05$) pour les courses avec charge. Il semble malgré tout que le test de natation avec charge est plus sensible que le test sans charge.

La figure 11 montre l'évolution des temps de natation pour les 10 courses consécutives. Chez les souris exposées à 25 ppm, nous constatons que les différences entre la première et la cinquième course sont plus marquées que chez les souris contrôle. Ce phénomène apparaît aussi lors des courses avec charge à 15 ppm. Ceci signifie que la fatigue est survenue plus rapidement chez les souris exposées que chez les souris contrôle.

Nous avons soumis l'ensemble des résultats des courses de natation à une analyse de variance . Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 29 .

Nous constatons que chacune des sources de variation étudiées est significative . Notons en particulier que les différences entre les trois concentrations étudiées sont statistiquement assurées .

Sur la base des résultats de l'analyse de variance (tableau 29) , nous avons analysé les **temps** pour chacune des 5 courses à l'aide du test de Duncan . Les résultats sont rapportés dans le tableau 30 . Nous constatons que les dernières courses avec charge des animaux exposés à 6 et 15 ppm sont significatives par rapport aux courses des animaux contrôle . Lors de l'exposition à 25 ppm , toutes les courses , avec et sans charge , à l'exception de la première , sont significatives par rapport à celles des animaux contrôle .

Toujours sur la base des résultats de l'analyse de variance (test de Duncan) , nous avons étudié les valeurs moyennes des temps de natation pour chaque jour de test . Ces valeurs sont rapportées dans le tableau 31 .

Nous constatons que les souris exposées présentent , lors des tests avec charge , des temps de natation plus longs que les souris contrôle . Les différences sont significatives lors de 6 séances . Le ralentissement est moins marqué lors des tests sans charge , à 15 ppm , il y a même une fois des résultats inverses . A 25 ppm , par contre , le ralentissement des souris exposées est très prononcé .

Il nous a semblé intéressant de savoir si les souris conservaient leur rang lors du test de natation . A cet effet , nous avons calculé les corrélations pour l'ordre des rangs selon Spearman . Les résultats sont rapportés dans le tableau 32 pour les animaux exposés et pour les animaux contrôle .

Les corrélations des rangs sont toujours significatives pour les souris exposées à l'acroléine ainsi que pour les animaux contrôle . L'ensemble des résultats montre qu'en général les souris se comportent , relativement aux tests de natation , d'une manière comparable d'un test à l'autre .

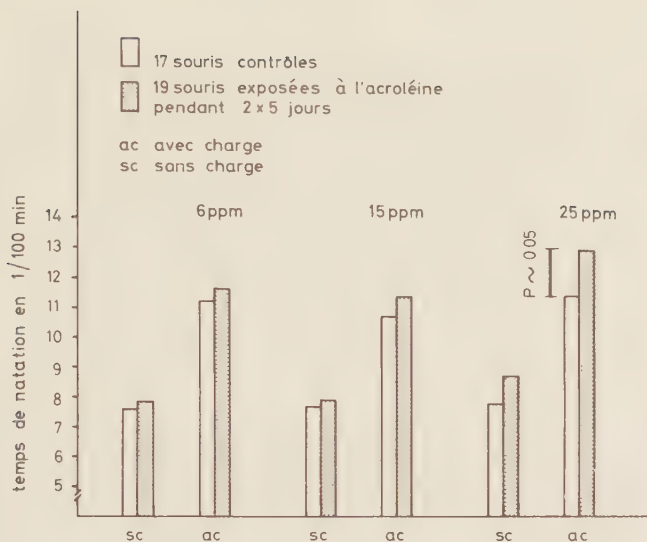


Fig.10 Moyennes des temps de natation

Chaque colonne représente la moyenne des quatre courses réalisées pendant deux semaines d'exposition.

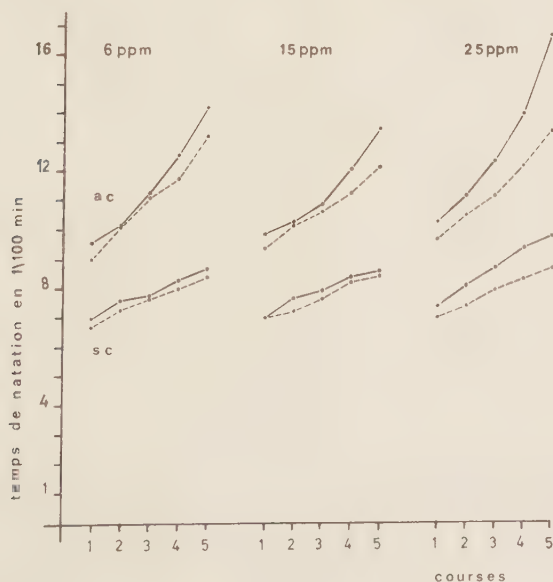


Fig.11 Evolution des temps de natation

— : 19 souris exposées ac : avec charge
--- : 17 souris contrôle sc : sans charge

Tableau 29 . Analyse de variance des temps de natation

sources de variation	degrés de liberté	produits des carrés	valeurs de F	p
courses	4	67,57	496,82	< 0,01
jours	3	1,46	10,69	< 0,01
poids	1	76,57	563,02	< 0,01
concentr.	2	19,14	140,76	< 0,01
sous-groupes	1	29,30	215,40	< 0,01

Tableau 30 . Moyennes des temps de natation des 5 courses avec et sans charge lors des expositions à 6, 15, et 25 ppm d'acroléine

temps de natation (indiqués en 1/100 min.) des animaux:					
conc. (ppm)	courses no.	exposés sans charge	contrôle sans charge	exposés avec charge	contrôle avec charge
6	1	7,02	6,77	9,61	9,01
	2	7,56	7,33	10,23	10,12
	3	7,77	7,69	11,30	11,22
	4	8,26	8,04	12,63 *	11,82
	5	8,66	8,41	14,24 *	13,42
15	1	7,04	7,00	9,88	9,38
	2	7,68	7,27	10,32	10,16
	3	7,98	7,74	10,88	10,70
	4	8,38	8,26	12,01 *	11,33
	5	8,55	8,50	13,46 **	12,16
25	1	7,44	6,98	10,31	9,74
	2	8,12 *	7,43	11,20 *	10,52
	3	8,75 *	7,96	12,42 **	11,22
	4	9,38 **	8,28	14,01 **	12,24
	5	9,75 **	8,69	16,76 **	13,41

Les astérisques signalent des valeurs significativement différentes (test de Duncan) par rapport aux valeurs contrôle correspondantes.

* : p < 0,05

** : p < 0,01

Tableau 31 . Moyennes des temps de natation pour chaque jour de test
lors des expositions à 6, 15, et 25 ppm .

conc. (ppm)	jours de test	temps de natation (indiqués en l/100 min.) des animaux:			
		exposés sans charge	contrôle sans charge	exposés avec charge	contrôle avec charge
6	2	8,00	7,84	11,95 *	11,50
	5	7,84	7,60	11,16	11,07
	9	7,90	7,57	12,05	11,71
	12	7,70	7,60	11,35	10,85
15	2	7,49	7,62	11,00	10,78
	5	8,08	7,70	11,05	10,86
	9	7,74 *	8,23	12,16 **	10,40
	12	7,84	8,18	11,34 *	10,65
25	2	8,31	7,91	11,25	11,71
	5	9,13 **	7,77	13,58 **	11,10
	9	8,66 **	8,00	13,72 **	11,70
	12	8,67 **	7,79	12,75 **	11,68

Les astérisques signalent des valeurs significativement différentes
(test de Duncan) par rapport aux valeurs contrôle correspondantes.

* : $p < 0,05$

** : $p < 0,01$

Tableau 32 . Coefficients de corrélation R des rangs selon Spearman pour
les tests de natation des souris exposées à l'acroléine et
pour les souris contrôle .

souris exposées (n = 19)

ppm	6	15	25
6		0,476 *	0,563 *
15			0,770 *
25			

souris contrôle (n = 17)

ppm	0	0	0
0		0,495 *	0,563 *
0			0,769 *
0			

* : résultats significatifs $p < 0,05$

6.5.2. Mortalité lors de l'exposition chronique

Nous avons suivi l'évolution de la mortalité sur le groupe I (voir 6.4.3., 6.4.5.). Nous avons prévu que l'expérience durerait 2 fois 5 jours pour les concentrations de 6, 15, 25, et 50 ppm. Mais l'exposition à 50 ppm a dû être interrompue après 6 heures. Il n'y a aucun doute sur le fait que toutes les souris seraient mortes si nous avions prolongé l'exposition à 50 ppm pendant 10 jours, comme dans le cas des expériences antérieures. Nous n'avons donc pas poursuivi les expériences, car nous voulions garder des souris entraînées à la natation afin d'étudier le phénomène de restitution.

Aucune souris n'est morte jusqu'à la fin de l'exposition à 25 ppm. Lors de l'exposition à 50 ppm, 9 souris sont mortes après 6 heures d'exposition, et 13 souris dans les heures suivantes. Au bout de 24 heures, il y a eu au total 22 souris mortes sur 47 exposées, soit 46,6 %. Dans les 10 jours suivants, 4 autres souris moururent vraisemblablement des suites de l'exposition à l'acroléine.

La mortalité fut la même pour le sous-groupe de souris entraînées que pour le sous-groupe de souris non entraînées à la natation. Dans un essai complémentaire, nous avons exposé 34 souris à 50 ppm pendant 5 jours. La mortalité croît très fortement au cours de l'expérience, comme le montre la figure 12 et le tableau 33.

L'augmentation de la mortalité montre que les effets de l'acroléine sont cumulatifs.

A 25 ppm, nous constatons qu'aucune souris n'est morte, tandis qu'à 50 ppm, 91 % des souris sont mortes au bout de 5 jours d'expérience. Ces deux valeurs montrent que la LC_{50} chronique se situe entre 25 et 50 ppm, sans qu'on puisse toutefois calculer cette grandeur avec précision.

6.5.3. Mortalité lors de l'exposition de toxicité aiguë

108 souris réparties en 4 sous-groupes furent exposées pendant 6 heures à différentes concentrations d'acroléines. Les résultats sont rapportés dans le tableau 34.

La mortalité augmente en fonction de l'accroissement des concentrations. Aucune souris ne meurt lors de l'exposition à 31 ppm, 40 % meurent à 61 ppm, 75 % à 80 ppm, et 100 % à 119 ppm. Sur la base de ces résultats, nous avons calculé (selon Behrens) une LC_{50} approximative de 66 ppm pour une exposition de 6 heures.

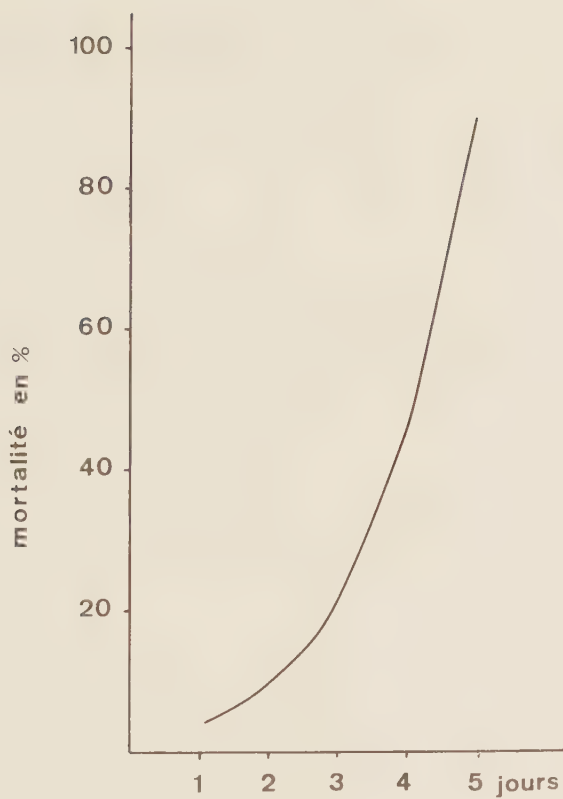


Fig.12 Etude de la mortalité chez 34 souris exposées pendant 5 jours consécutifs (6 heures par jour) à 50 ppm d'acroléine.

Tableau 33 . Mortalité de 34 souris exposées pendant 5 jours consécutifs (6 heures par jour) à 50 ppm d'acroléine

	premier jour	second jour	troisième jour	quatrième jour	cinquième jour
taux de mortalité par jour (en %)	6	3	12	26	44
taux de mortalité sommés	6	9	21	47	91

Tableau 34 . Mortalité enregistrée pendant l'exposition aiguë (6 heures d'exposition pour chacune des conc. étudiées)

conc. (ppm)	nombres de souris exposées	nombres de souris mortes	taux de mortalité en %
31	20	0	0
61	20	8	40
80	24	18	75
119	44	44	100

6.5.4. Poids corporel

Dans le cadre de l'expérience chronique, toutes les souris ont été pesées le quatrième jour de chaque semaine. Les résultats sont reproduits graphiquement à la figure 13, voir aussi le tableau 35. On constate que le groupe d'animaux contrôle, entraînés deux fois par semaine à la natation, accuse une élévation marquée de poids corporel pendant la période d'observation de 6 semaines. Il est intéressant de constater que le groupe de souris contrôle non entraînés à la natation ne présente qu'une faible augmentation de poids corporel.

Une différence semblable se manifeste pour le poids corporel des sous-groupes A et C. Là aussi, les souris exposées entraînées à la natation (sous-groupe A) pèsent davantage que les souris exposées

non entraînées (sous-groupe C). La figure 13 montre que le poids corporel des souris exposées est inférieur à celui des souris non exposées. Cette différence de poids se manifeste à la fin de la deuxième semaine d'exposition à 6 ppm.

Dans le tableau 35, nous avons rassemblé les poids corporels de toutes les souris soumises au test de natation. Ces animaux furent pesés individuellement, ce qui nous a permis d'analyser statistiquement les résultats. A cet effet, nous avons calculé (test de Wilcoxon) la signification entre les deux sous-groupes, ceci pour chacune des semaines d'expérience.

Nous constatons en effet que la moyenne des poids corporels a diminué chez les souris exposées à partir de la deuxième semaine d'exposition à 6 ppm d'acroléine. Les différences entre les deux sous-groupes s'accroissent jusqu'à la fin de la sixième semaine (fin de l'exposition à 25 ppm). Lors de la troisième semaine de restitution, les différences restent significatives, bien que les valeurs présentent une tendance à la normalisation.

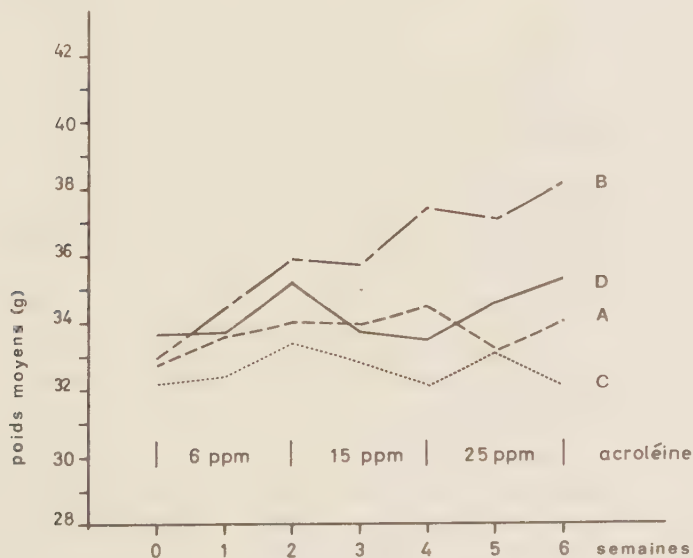


Fig.13 Poids corporels des souris contrôle et exposées

- A : souris exposées entraînées à la natation
- B : souris contrôle entraînées à la natation
- C : souris exposées non entraînées à la natation
- D : souris contrôle non entraînées à la natation

Tableau 35 . Evolution des poids corporels des souris exposées à l'acroléine et soumises deux fois par semaine aux tests de natation .

* : à la septième semaine , l'exposition à 50 ppm n'a duré qu'un jour.
Passé cette période , les souris furent exposées à de l'air frais
(phase de restitution)

semaines	nombres de souris	animaux	conc. (ppm)	poids moyens g	diff. des poids moyens	test de Wilcoxon p
1	19	exposés	6	33,57	0,8	> 0,05
	17	contrôle	-	34,44		
2	19	exposés	6	34,02	1,9	< 0,05
	17	contrôle	-	35,94		
3	19	exposés	15	33,94	1,8	< 0,05
	17	contrôle	--	35,69		
4	19	exposés	15	34,52	2,9	< 0,01
	17	contrôle	--	37,41		
5	19	exposés	25	33,15	3,9	< 0,01
	17	contrôle	--	37,10		
6	19	exposés	25	34,04	4,1	< 0,01
	17	contrôle	--	38,16		
7 *	7	exposés	50	28,21	12,5	< 0,01
	17	contrôle	--	40,69		
8	7	exposés	--	33,29	9,1	< 0,01
	17	contrôle	--	42,35		
9	6	exposés	--	35,67	6,4	< 0,01
	17	contrôle	--	42,05		

6.5.5. Corrélation entre poids corporels et temps de natation

Comme l'exposition à l'acroléine a provoqué chez les souris une détérioration des performances de natation et une inhibition de la croissance du poids corporel, nous nous sommes demandés s'il existe une corrélation entre ces deux phénomènes. A cet effet, nous avons calculé le coefficient de corrélation de Spearman. Pour chaque souris, nous avons comparé les temps de natation avant et pendant la période d'exposition à l'acroléine (voir 3.3.1.: entraînement). Nous avons fait le même calcul relativement aux poids corporels. A partir des différences des temps de natation, et des différences des poids corporels, nous avons établi un ordre des rangs et calculé ensuite les valeurs de R et de p. Les résultats sont reportés dans le tableau 36.

Ces calculs nous montrent qu'il existe une corrélation significative entre les deux phénomènes. Ceci nous permet d'affirmer que les souris dont la croissance corporelle a été fortement inhibée par l'acroléine, ont également présenté un ralentissement marqué des temps de natation, contrairement aux souris dont la croissance a été peu influencée par l'acroléine.

Notons qu'il n'existe pas de corrélation significative entre les deux phénomènes chez les souris non exposées à l'acroléine. Ceci signifie qu'il n'existe pas de corrélation entre poids corporels et performances de natation chez les souris normales.

Tableau 36. Coefficients de corrélation des rangs selon Spearman pour les différences des temps de natation, et pour les différences des poids corporels.

animaux	conc. (ppm)	coefficients R selon Spearman			
		deuxième jour	cinquième jour	neuvième jour	douzième jour
19 exp.	6	0,152	0,088	0,306	0,341
19 exp.	15	0,521 *	0,372	0,473 *	0,689 **
19 exp.	25	0,548 *	0,498 *	0,710 **	0,592 *
17 contr.	--	0,070	-0,260	0,006	-0,287

* : $p < 0,05$

** : $p < 0,01$

Pour les animaux contrôle, les corrélations entre poids et temps de natation furent calculées pour la cinquième et pour la sixième semaine d'expérience.

6.5.6. Analyses histologiques

L'analyse des trachées n'a pas révélé d'altérations notables. Par contre, les coupes des poumons ont montré à plusieurs reprises des atélectasies, des inflammations cellulaires et oedémateuses, ainsi que des élargissements du lumen des alvéoles et des bronches. Les atélectasies (fermetures partielles ou totales des alvéoles) peuvent être dues à des pressions extérieures: oedèmes, effets mécaniques des tissus environnants, spasmes bronchiques, etc. Des foyers inflammatoires peuvent également produire des atélectasies. Nous avons résumé les résultats de l'analyse histologique dans le tableau 37.

Les souris contrôle n'ont pas présenté de modifications pathologiques. Occasionnellement, on a relevé des épaississements des septa alvéolaires et des rétrécissements des lumens des alvéoles. Nous pouvons conclure que l'exposition à l'acroléine a produit des irritations des poumons qui ont donné naissance à des états inflammatoires dans la majorité des cas.

Tableau 37. Résultats de l'analyse histologique des poumons de 15 souris exposées à l'acroléine

observations histologiques	nombres de souris atteintes
atélectasies	7
inflammations cellulaires	7
inflammations oedémateuses	5
élargissements des alvéoles et des bronches	2

6.6. Discussion

6.6.1. Test de natation

L'exposition à l'acroléine a provoqué une baisse des temps de natation qui s'accroît avec l'augmentation de la concentration. Le ralentissement (mesuré par la différence des temps de natation entre souris exposées et souris contrôle pour des courses de même rang), est plus marquée pour les dernières courses que pour les premières. Ce ralentissement reflète certainement un phénomène de fatigue. Pour l'acroléine, l'analyse de la fatigabilité par le test de Duncan s'est révélée plus sensible que le simple calcul des moyennes des temps de natation.

Alors que nos expériences de natation permettent de mesurer les performances physiques forcées, Murphy [71] a étudié chez les souris les performances physiques non forcées (mesure de la motilité dans une roue mobile), et il a trouvé qu'une seule exposition de 6 heures à 0,9 ppm d'acroléine diminuait ces performances de 25 %. La comparaison de nos résultats avec ceux de Murphy nous permet de supposer que l'enregistrement de l'activité physique spontanée constitue une méthode plus sensible que nos tests de natation. Cependant, il est fort probable que la diminution de l'activité physique spontanée n'est pas due à une diminution de la capacité physique des animaux, mais à une baisse de la motivation. Notons encore que Murphy [71] a enregistré l'activité spontanée pendant l'exposition, tandis que nos tests de natation avaient lieu après l'exposition.

Nous avons remarqué que les corrélations des rangs sont toujours significatives pour les souris exposées à l'acroléine. Ceci signifie que les souris exposées réagissent d'une manière uniforme à l'acroléine.

Relevons ici que nos souris exposées à 25 ppm d'acroléine ont présenté des atteintes pathologiques décelées par l'analyse histologique. Nous pensons que ces dernières sont en relation avec la baisse des performances de natation.

Des 19 souris exposées de façon chronique à des concentrations de 6, 15, 25, et une seule fois 50 ppm, 6 seulement ont survécu. Après deux semaines de repos (inhalation d'air frais), ces dernières ont été soumises au test de natation. Les résultats obtenus sont sensiblement les mêmes que ceux des souris contrôle.

6.6.2. Mortalité lors d'expositions chroniques et aiguës

Nous n'obtenons pas de mortalité lors des expositions chroniques à 6, 15, et 25 ppm. À 50 ppm, 47 % des animaux meurent pendant le premier jour d'exposition.

Dans une expérience supplémentaire, il a fallu 4 jours d'exposition à 50 ppm (6 heures par jour) pour obtenir une mortalité de 47 %. D'après ces résultats, nous pouvons conclure que les expositions à 6, 15, et 25 ppm provoquent des lésions, qu'un seul jour d'exposition à 50 ppm rend léthales.

Jacobs [75] a exposé des souris à 3 ppm d'acroléine pendant quelques heures et n'a enregistré aucune mortalité. Murphy [16] n'a pas observé de mortalité chez des rats exposés à 4,1 ppm pendant 20 heures, à 2,1 ppm pendant 40 heures, et à 1 ppm pendant 80 heures. Ces résultats ne

sont donc guère comparables aux nôtres, puisque ces auteurs n'ont pas soumis leurs animaux à des expositions léthales.

La mortalité enregistrée lors d'expositions de 6 heures à différentes concentrations croît linéairement en fonction de la concentration d'acroléine. Ces résultats ont permis de calculer une LC_{50} aiguë de 66 ppm. Il est difficile de comparer notre LC_{50} aiguë avec celles déterminées par d'autres auteurs. Ces derniers ont fait des expériences avec des animaux différents, des rats surtout, et les durées d'exposition sont également différentes. Les résultats obtenus montrent que les souris sont plus sensibles à l'acroléine que les rats. Jacobs [75] trouve une mortalité de 60 % chez des souris exposées à 152 ppm pendant 10 minutes. Salem [51] trouve une mortalité de 100 % lorsqu'il expose des souris à 2038 ppm pendant 17 minutes.

6.6.3. Poids corporel

Aux concentrations de 6, 15, et 25 ppm, l'acroléine provoque une inhibition statistiquement assurée de l'augmentation du poids corporel. Après 6 semaines d'expérience, les animaux exposés pèsent en moyenne 4 g (environ 10 %) de moins que les animaux contrôle. La phase de restitution de 2 semaines permet aux souris de regagner du poids, sans pour autant reprendre leur poids normal. En gros, les résultats correspondent à ceux des tests de natation. En effet, les calculs de corrélation ont montré pour les animaux exposés à l'acroléine une relation significative entre le ralentissement des temps de natation et le ralentissement de la croissance. Pour les effets chroniques de l'acroléine, nous pouvons conclure que le poids corporel est un critère plus sensible que le test de natation. Les critères de toxicité les moins sensibles sont la mortalité chronique et la mortalité aiguë.

Murphy [72] a observé chez des rats exposés à 8 ppm d'acroléine pendant 4 heures, une anorexie et une augmentation du taux de phosphatases alcalines du foie et des transaminases, ainsi qu'une augmentation de poids des surrénales. Il attribue cette augmentation de poids des surrénales à une irritation non spécifique de l'acroléine qui influencerait l'activité enzymatique du foie. Murphy suppose que l'acroléine stimule le système hypophysaire-surrénalien. Nous constatons que les animaux entraînés à la natation, qu'ils appartiennent aux groupes des animaux contrôle ou exposés, accusent un poids corporel plus élevé que celui des animaux non entraînés à la natation.

Donc les deux facteurs : exposition et non-entraînement inhibent l'augmentation de poids, tandis que les deux facteurs : non-exposition et entraînement agissent en sens contraire. Les souris entraînées et exposées, et les souris non-entraînées contrôle, ont des poids sensiblement égaux.

Nous pouvons tirer de cette analyse la conclusion suivante : L'activité physique déployée au cours des tests de natation favorise l'augmentation du poids corporel et neutralise partiellement les effets de l'acroléine sur la baisse du poids corporel.

7. Discussion générale et comparaison des trois gaz irritants

7.1. Comparaison des tests

Les tests que nous avons choisis pour nos expériences (natation, mortalité chronique, mortalité aiguë, poids corporel), se sont révélés de sensibilité différentes. Pour chaque gaz irritant étudié, nous avons déterminé les seuils de sensibilité relatifs à chacun de ces tests. Rappelons qu'un seuil de sensibilité est défini comme étant la concentration minimale (en ppm) qui donne lieu à une différence de qualité (au sens du test considéré) statistiquement significative entre les animaux exposés à un gaz irritant, et d'autres non exposés (animaux contrôle).

Pour le test de natation, on obtient des seuils différents selon qu'on tient compte, séparément ou non, de chaque course effectuée lors des expériences de natation (voir 4.5.1., 5.5.1., 6.5.1.). Dans le premier cas, la statistique tient compte de la détérioration des temps de natation d'une course à la suivante. Notons ici que les gaz irritants étudiés ont un effet marqué sur ce phénomène de fatigabilité. Dans le second cas, la statistique ne tient compte que de la moyenne effectuée sur les différentes courses de natation. Le seuil de sensibilité ainsi obtenu ne tient pas explicitement compte de la fatigabilité.

Les seuils relatifs aux tests de natation sont rapportés dans le tableau 38. On constate que les seuils de fatigabilité (première colonne) sont inférieurs aux seuils déterminés d'après une valeur moyenne établie sur 5 courses consécutives (seconde colonne).

Le tableau 39 donne le classement des quatre tests effectués relativement à leur seuil de sensibilité. Selon que le seuil défini par le test de natation tient compte ou non de la fatigabilité, nous obtenons le classement indiqué dans la première colonne (*), ou celui indiqué

dans la seconde (**). La première méthode de classement a tendance à favoriser le test de natation comme candidat au premier rang. Nous pensons que les tests de natation et du poids corporel constitueraient des méthodes de détection plus sensibles que les tests de mortalité. Les résultats obtenus ne confirment que partiellement cette hypothèse: les tests de natation et de poids corporel occupent en effet le premier rang pour l'étude du NO_2 et de l'acroléine, alors que pour l'acétaldéhyde, le test du poids corporel est le moins sensible, les trois autres tests occupant des rangs équivalents (voir tableau 39). Il nous a paru intéressant d'étudier les rapports qu'on peut établir entre les différentes concentrations définies par le seuil de fatigabilité d'une part, et les LC_{50} aiguë et chronique d'autre part. Ces différentes concentrations sont données dans le tableau 40. On constate que les seuils de fatigabilité sont 3 à 10 fois plus bas que les concentrations léthales qui définissent les LC_{50} . Ceci confirme dans une certaine mesure l'une de nos hypothèses, à savoir qu'un test de comportement tel que le test de natation est plus sensible que les tests de mortalité. On s'attendait cependant à des rapports bien plus grands entre les sensibilités respectives à ces deux sortes de tests.

7.2. Toxicité des trois substances étudiées

La comparaison des résultats obtenus pour les trois substances étudiées montre que l'acroléine est la plus toxique. Ceci est en bon accord avec les données de la littérature. Dans le tableau 41, nous comparons les concentrations C_{eff} correspondant à la fumée de cigarette avec les concentrations minimales C_{min} pour lesquelles un critère au moins a donné des résultats statistiquement significatifs, et nous indiquons les quotients $C_{\text{eff}}/C_{\text{min}}$. Dans la dernière colonne, nous indiquons les limites tolérables L_t généralement observées dans l'industrie, et valables pour une exposition de longue durée (8 heures par jour). Ces limites indiquent les seuils au-dessus desquels des risques d'intoxication peuvent apparaître chez l'homme. Les quotients $C_{\text{eff}}/C_{\text{min}}$ nous permettent de définir, parmi les gaz irritants étudiés, un ordre de toxicité relatif à la fumée de cigarette, avec l'acroléine au premier rang, suivie du NO_2 et de l'acétaldéhyde.

Si nous admettons que l'homme montre la même sensibilité aux gaz étudiés que les animaux de nos expériences, nous pouvons affirmer que l'acroléine est, parmi les trois gaz irritants étudiés, le plus toxique pour les fumeurs.

Notre étude confirme des observations faites par d'autres auteurs, à savoir que les trois gaz examinés ont des effets pathologiques prononcés sur les voies respiratoires : Des signes d'inflammation, des oedèmes, des élargissements des alvéoles et des bronches, ainsi que des atélectasies ont été observés pour chacun des gaz étudiés. En outre, de très faibles concentrations d'acroléine ou de NO_2 suffisent pour diminuer la capacité physique de natation. Par conséquent, ces deux gaz doivent être très toxiques pour les voies respiratoires. On ne peut manquer de faire un rapprochement entre ces observations et les effets néfastes bien connus, tels que bronchites chroniques et emphysèmes, fréquemment observés chez les fumeurs de cigarettes. Les résultats de notre étude confirment donc l'hypothèse que les gaz irritants tels que l'acroléine et le dioxyde d'azote constituent des agents particulièrement nocifs pour les voies respiratoires, responsables des effets pathologiques décrits chez les fumeurs. Notre étude montre que la sensibilité de la méthode dépend dans une large mesure des mécanismes d'action, et du lieu d'impact des agents toxiques. Pour le NO_2 , on est en droit de penser que le lieu d'impact de ce gaz irritant se situe avant tout au niveau des voies respiratoires, provoquant notamment une baisse de la capacité physique observée dans les temps de natation.

Considérant que la perte de poids reflète les effets des gaz irritants sur le métabolisme, et que le test de natation reflète les effets des gaz irritants sur les voies respiratoires, nous tirons les conclusions suivantes : Les effets de l'acroléine portent non seulement sur les voies respiratoires, mais aussi sur le métabolisme. Ces résultats sont en accord avec ceux de Murphy [16, 72], qui décèle diverses modifications d'enzymes, ainsi qu'une stimulation du système hypophysaire surrénalien.

Dans le cas de l'acétaldéhyde, aucun des tests effectués ne joue un rôle dominant, et leurs résultats n'en sont que plus difficiles à interpréter : Ce gaz irritant attaque les voies respiratoires, et joue certainement un rôle important dans le métabolisme. En plus, nos expériences montrent que l'acétaldéhyde a également des effets prononcés sur le système nerveux central : à des concentrations moyennes, il produit une excitation considérable et caractéristique, tandis qu'à des concentrations élevées, on observe une profonde torpeur des animaux. L'ensemble de notre étude nous conduit à la conclusion suivante : Du point de vue de la médecine préventive, il serait souhaitable de rendre la fumée de cigarette moins toxique : Une élimination de l'acroléine et du NO_2 , que nos expériences désignent parmi les gaz irritants les plus toxiques de la fumée de cigarette, constituerait une contribution

Tableau 38 . Comparaison entre les seuils de fatigabilité et les seuils définis d'après la moyenne de toutes les courses.
(voir 7.1.)

gaz irritants	seuils en ppm relatifs au test de natation:	
	pour la fatigabilité	pour les moyennes sur toutes les courses
NO ₂	40	100
acétaldéhyde	2500	5000
acroléine	6	25

Tableau 39 . Classement des tests effectués relativement à leur sensibilité .

Selon que le seuil de sensibilité défini par le test de natation tient compte ou non de la fatigabilité, on obtient les classements indiqués dans la première colonne (*) ou dans la seconde (**).

	NO ₂		acroléine		acétaldéhyde	
	*	**	*	**	*	**
test de natation	1	1	1	2	1	1
mortalité chronique	3	3	2	3	2	1
mortalité aiguë	2	2	3	4	2	1
poids corporel	4	4	1	1	3	2

Tableau 40 . Comparaison des seuils de fatigabilité avec les LC₅₀ aiguë et chronique .

gaz irritants	seuils de fatigabilité (ppm)	LC ₅₀ aiguës (ppm)	LC ₅₀ chroniques (ppm)
NO ₂	40	140	—
acétaldéhyde	2500	8000	7000
acroléine	6	66	25 - 50

Tableau 41 . Concentrations minimales ($C_{\min}$) pour lesquelles l'un au moins des tests donne des résultats statistiquement significatifs, et concentrations effectives (C_{eff}) dans la fumée de cigarette .

substances	$C_{\min}$ (ppm)	C_{eff} [1, 3] (ppm)	$C_{\text{eff}}/C_{\min}$	L.t [70] (ppm)
NO_2	40	250	6,25	5
acétaldéhyde	2500	1300 - 3200	0,52 - 1,28	200
acroléine	6	76 - 150	12,7 - 25	0,1

Bibliographie

- [1] Wynder, E.L. and Hoffmann, D. : Tobacco and tobacco smoke
New-York, Academic Press 1967 .
- [2] Keith, C.H. and Tesh, P.G. : Measurement of the total smoke issuing
from a burning cigarette . Tobacco Sci., 9 , 61 - 64 , 1965 .
- [3] Smoking and Health : Report of the Advisory Committee to the Surgeon
General of the Public Health Service . Washington D.C. U.S. Public
Health Service Publication N° 1103 , 1964 .
- [4] Dontenwill, W., Reckzeh, G., Stadler, L. : Inhalationsexperimente mit
Zigarettenrauch . Beitr. Tabakforschung 3 , 438 - 448 , 1966 .
- [5] Harris, R.J.C. and Negroni, G. : Production of lung carcinomas in C 57BL
mice exposed to a cigarette smoke and air mixture .
Brit.med.J. 4 , 637 - 641 , 1967 .
- [6] Reckzeh, G. and Dontenwill, W. : Effects of cigarette smoke on hamsters .
Arch. Env. Health 20 , 7 - 15 , 1970 .
- [7] Reckzeh, G. and al. : Untersuchungen zur Bestimmung der akuten und
chronischen Toxizität von Zigarettenrauch bei passiver Berauchung
von Versuchstieren . Z . Arzneimittelforschung 19 , 237 - 241 , 1969 .
- [8] Rücker, K. and Dontenwill, W. : Tierexperimentelle Untersuchungen über
die Beeinflussung der Atmung während der Inhalation von Zigaretten-
rauch . Beitr. Tabakforschung 4 , 40 - 44 , 1967 .
- [9] Documenta Geigy . Tables scientifiques . Editeur: J.R. Geigy S.A.
Département pharmaceutique , sixième édition 1963 .
- [10] Bättig, K. : Das Schwimmen von Ratten durch einen Wasserkanal .
Methodische und pharmakologische Einflüsse auf Leistung und
Ermüdung . Helv . Physiol . Acta 19 , 384 - 398 , 1961 .
- [11] Carson, T.R. and al. : The responses of animals inhaling nitrogen
dioxide for single , short - term exposures .
Amer . indust . Hyg. Ass . J . 23 , 457 - 462 , 1962 .

- [12] Gray, E. LeB. : Oxides of nitrogen: Their occurrence, toxicity, hazard. Arch. ind. Health 19, 479 - 485, 1959.
- [13] Gray, E. LeB. and al : Toxicity of the oxides of nitrogen. II Acute inhalation of NO₂, red fuming nitric acid, and white fuming nitric acid. Arch. indust. Hyg. 10, 418 - 422, 1954.
- [14] Haydon, G. B., Freeman, G., Furiosi, N. J. : Covert pathogenesis of NO₂ induced emphysema in the rat. Arch. Env. Health 11, 776 - 783, 1965.
- [15] Ehrlich, R. : Effects of air pollutants on respiratory infection. Arch. Env. Health 6, 638 - 642, 1963.
- [16] Murphy, S. D., Davis, H. V., Zaratzian, V. L. : Biochemical effects in rats from irritating air contaminants. Tox. and appl. Pharm. 6, 520 - 528, 1964.
- [17] Murphy, S. D. and al. : Altered function in animals inhaling low concentrations of ozone and nitrogen dioxide. Amer. Indus. Hyg. Ass. J. 25, 246 - 253, 1964.
- [18] Buckley, R. D., Balchum, O. J. : Acute and chronic exposures to nitrogen dioxide. Arch. Env. Health 10, 220 - 223, 1965.
- [19] Dumont, G. : Einfluss der Luftfeuchte auf die Vergiftung mit nitrosen Gasen bei kurzzeitiger Einwirkung hoher Konzentrationen. Med. Inaugural Diss. Würzburg, 1966.
- [20] Steadman, B. L. and al. : Effects on experimental animals of long term continuous inhalation of nitrogen dioxide. Tox. and Appl. Pharmacol. 9, 160 - 170, 1966.
- [21] Studier, R. : Einfluss der Luftfeuchte auf die Vergiftung mit nitrosen Gasen bei Langzeiteinwirkung kleiner Konzentrationen. Med. Inaug. Diss. Würzburg, 1966.
- [22] Verein Deutscher Ingenieure (VDI)-Richtlinie 2105 Nitrose Gase, VDI - Verlag, Düsseldorf, 1960.
- [23] Diggle, W. M., Gage, J. C. : Toxicity of nitrogen pentoxide. Brit. J. industr. Med. 11, 140 - 144, 1954.
- [24] Pfitzer, E. A. and al. : Acute toxicity of red fuming nitric acid-hydrofluoric acid vapor mixture. Arch. indust. Health 18, 218 - 221, 1958.

- [25] Wagner, W.D. and al.: Experimental study of threshold limit NO_2 .
Arch. Env. Health 10, 455 - 466, 1965.
- [26] Gray, E. LeB., Mac Namee, J.K., and Goldberg, S.B.: Toxicity of NO_2 vapors at very low levels. A preliminary report. Arch. indust. Hyg. 6, 20 - 21, 1952.
- [27] Thomas, H.V., Mueller, P.K., Wright, R.: Response of rat lung mast cells to nitrogen dioxide inhalation. J. of Air Pollution Control. Assoc. 17, 33 - 35, 1967.
- [28] Buckley, R.D., Balchum, O.J.: Enzyme alterations following NO_2 exposures. Arch. Env. Health 14, 687 - 692, 1967.
- [29] Gray, E. LeB., Goldberg, S.B., and Patton, F.M.: Toxicity of the oxides of nitrogen. III Effects of chronic exposure to low concentrations of vapors from red fuming nitric acid. Arch. indust. Hyg. 10, 423 - 425, 1954.
- [30] Ripperton, L.A., Johnston, D.R.: Effects on growing animals of a continuous exposure to experienced concentrations of NO_2 . Amer. indust. Hyg. Ass. J. 20, 324 - 326, 1959.
- [31] Freeman, G., Haydon, G.B.: Emphysema after low level exposure to NO_2 . Arch. Env. Health 8, 125 - 128, 1964.
- [32] Balchum, O.J. and al.: Nitrogen dioxide inhalation and lung antibodies. Arch. Env. Health 10, 274 - 277, 1965.
- [33] Tollman, J.P., Mac Quiddy, E.L., Schonberger, S.: Inhalation of filtered carbon arc fumes and oxides of nitrogen. J. indust. Hyg. 23, 269 - 275, 1941.
- [34] Freeman, G., Furiosi, N.J. and Haydon, G.B.: Effects of continuous exposure of 0,8 ppm NO_2 on respiration of rats. Arch. Env. Health 13, 454 - 456, 1966.
- [35] Valada, P.: Sur la toxicité des vapeurs nitreuses. Mem. poudres 33, 487, 1951. (cité par Bollmann, T. [44]).
- [36] Lehmann, K.B., Hasegawa, : Studien über die Wirkung technisch und hygienisch wichtiger Gase und Dämpfe auf den Menschen. XXXI. Die nitrosen Gase. Arch. f. Hyg. 77, 323 - 368, 1913.

- [37] Henschler, D. and al.: Geruchsschwellen einiger wichtiger Reizgase (Schwefeldioxyd, Ozon, Stickstoffdioxyd) und Erscheinungen bei der Einwirkung geringer Konzentrationen auf den Menschen. Arch. für Gewerbehygiene 17, 547 - 570, 1960.
- [38] Franke, H., Krauland, W. and Ruckenstein, E.: Vergiftungen durch nitrose Gase aus Sprengbomben. Schweiz.med.Wschr. 78, 256, 1948.
- [39] Patty, F.A.: Industrial hygiene and toxicology. New-York, Intersci. 1948.
- [40] Hygienic Guide Series: Nitrogen dioxide. Amer. indust. Hyg. Ass. J. 17, 232 - 233, 1956.
- [41] Schultz-Brauns, U.: Virchow's Arch. 277, 174, 1930. (cité par Hahn [43]).
- [42] Henschler, D. and Lütge, W.: travaux non publiés. Pharmak.Inst.Würzburg 1960. (cité par Hahn [43]).
- [43] Hahn, E.Th.: Zum Mechanismus einer Toleranzsteigerung gegen toxische Lungenödeme bei wiederholter Reizgaseinatmung. Untersuchungen mit nitrosen Gasen. Med. Inaug. Diss. Würzburg, 1960.
- [44] Bollmann, T.: Die biologische Wirkung von nitrosen Gasen, Schwefeldioxyd und Schwefelsäure auf Tiere und Menschen. Med. Inaug. Diss. Düsseldorf, 1963.
- [45] ASTM Standards on methods of atmospheric sampling and analysis, published by the American society for testing and materials. Philadelphia second edition, 81 - 85, 1962.
- [46] Stokinger, H.E.: Toxicologic interactions of mixtures of air pollutants. Review of recent developments. Int.J.Air Poll. 2, 313 - 326, 1960.
- [47] Henschler, D. and al.: Mechanismus einer Toleranzsteigerung bei wiederholter Einatmung von Lungenödem erzeugenden Gasen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. und Pharmak. 249, 343 - 356, 1964.
- [48] Henschler, D., Hahn, E. and Assmann, W.: Wirkungsbedingungen einer Toleranzsteigerung bei wiederholter Einatmung von Lungenödem erzeugenden Reizgasen. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharmak. 249, 325 - 342, 1964.

- [49] Smyth, H.F. jr. : Hygienic standards for daily inhalation .
Amer. ind. Hyg. Ass. Quart. 17, 129 - 185, 1956 .
- [50] Fairhall, L.T. : Industrial toxicology . Williams and Wilkins ,
Baltimore, 1949 .
- [51] Salem, H. : The phenomena associated with respiration of aerosols
and gases . Thesis , University of Toronto , 1958 .
- [52] Sim, Van M., Pattle, R.E. : J. Amer. Med. Ass. 165, 1957. (cité par Salem [51]).
- [53] Wirth, W., Hecht, G., Gloxhuber, Chr. : Toxikologie Fibel .
Georg Thieme Stuttgart, 1967 .
- [54] Hald, J., Jacobson, E. : Acta Pharmac. 5, 305, 1948 . (cité par Asmussen [55])
- [55] Asmussen, E., Hald, J., Larsen, V. : The pharmacological action of acetal-
dehyd on the human organism . Acta pharm. 4, 311 - 320, 1948 .
- [56] Büttner, J. : Untersuchungen über den Stoffwechsel des Acetaldehyds im
menschlichen und tierischen Organismus . Habilitationsschrift .
Christian Albrechts Universität Kiel, 1963 .
- [57] Pace, D.M., Eliot, A. : Etudes des effets de l'acétaldéhyde sur les
cellules tissulaires cultivées in vitro . Cancer . research 20,
868 - 875, 1960 .
- [58] Guillerm, R., Badré, R., Vignon, B. : Effets inhibiteurs de la fumée de
tabac sur l'activité ciliaire de l'épithélium respiratoire et
nature des composants responsables . Bull. Acad. Nat. Med. 20, 416 - 423,
1961 .
- [59] Nogare, S., Norris, T.O., Mitchell, J. : Bestimmung von Acetaldehyd mit
der Iodreaktion . Anal. Chem. 23, 1473, 1951 .
- [60] Ywanoff, N. : Experimentelle Studien über den Einfluss technisch und
hygienisch wichtiger Gase und Dämpfe auf den Organismus .
Teil XVI, XVII, XVIII : über einige praktisch wichtige Aldehyde
(Formaldehyd, Acetaldehyd, Acrolein). Arch. Hyg. (Berlin) 73,
307 - 340, 1911 .
- [61] Skog, E. : A toxicological investigation of lower aliphatic aldehydes .
Acta pharmacol. (Kbh) 6, 229 - 318, 1950 .

- [62] Cook, W.A. : Maximum allowable concentrations of industrial atmospheric contaminants . Ind . Med . 14 , 936 - 946 , 1945 .
- [63] Beiträge zur Tabakforschung 41 , 94 - 123 , 1968 .
- [64] van der Waerden, B.L. : Statistique mathématique . 249 - 259 , Dunod , Paris , 1968 .
- [65] Hygienic Guide Series : Acrolein . Amer . indust . Hyg . Ass . J . 24 , 286 - 287 , 1953 .
- [66] Koelsch, F. : Gewerbliche Vergiftung durch Acrolein . Zbl . Gewerbehyg . 15 , 353 - 354 , 1928 .
- [67] Champeix, J., Catilina, P. : Les intoxications par l'acroléine . Paris , Masson , 1967 .
- [68] Derobert, L. : Intoxications et maladies professionnelles . • Paris , Flammarion , 1958 .
- [69] Plotnikova, M. : Estimation du taux d'acroléine polluant l'atmosphère . Gigiena i Sanitaria (U.R.S.S.) , 22 (6) , 1957 .
- [70] American Conference of Governmental Industrial Hygienists: Threshold limit value for 1963 . J . Occup . Med . 5 , 491 - 498 , 1963 .
- [71] Murphy, S.D., Davis, H.V., Ulrich, C.E. : Functional effects of acrolein exposure (abstracts) . Fed . Proceed . 21 , 221 , 1962 .
- [72] Murphy, S.D. : Mechanism of the effect of acrolein on rat liver enzyme . Toxicol . appl . Pharmacol . 7 , 833 - 843 , 1965 .
- [73] Cohen, I.R., Saltzman, B.E. : Determination of acrolein : 4-hexylresorcinol method . Selected methods for the measurements of air pollutants . Washington D.C., U.S. Public Health Service Publ . N° 999 - AP - 11 , 1965 .
- [74] Carpenter, C.P., Smyth, H.F., Pozzani, U.C. : The assay of acute vapor toxicity and the grading and interpretation of results on 96 chemical compounds . J . indust . Hyg . 31 , 343 - 346 , 1949 .
- [75] Jacobs, M. : The analytical chemistry of industrial poisons , hazards and solvents . New-York , Interscience , 1948 .

- [76] Grandjean, E., Capitaine, C., Gilgen, A.: Toxikologische Wirkungen durch Inhalation von NO_2 bei der Maus. Z. Präventiv-Med. 13, 142-157, 1968.
- [77] Capitaine, C.: Action physiologique et toxicologique de l'acétaldéhyde chez la souris. Z. Präventiv-Med. 13, 215-216, 1968.
- [78] Shell Chemical Corporation: Acrolein. Toxicity Data Sheet Sc. 57-76, 1957. (cité par Smith, C.W., Acrolein. New-York, John Wiley, 1962).
- [79] Collins, M.A. and Cohen, G.: Alcoholism: Alkaloids suspect. Chemical and Engineering News 46, 13-14, 1968.
- [80] Bild der Wissenschaft: Trunksucht über Rauschgiftbildung. Feb. 1969.
- [81] Veith, K.: Les effets de quelques lésions électrolytiques sous-corticales sur le comportement du rat. Thèse, Université de Genève, 1970.

